

AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO DOS FLAVÍVIRUS: NOVAS PERSPECTIVAS



<https://doi.org/10.22533/at.ed.5581125090110>

Data de aceite: 20/01/2025

Flavio Henrique Lima Fernandes

Programa de Pós-Graduação em
Ciências Aplicadas à Saúde – PPGCAS,
Instituto de Ciências da Saúde – ICS –
Universidade Federal de Jataí -UFJ

Marcos Lázaro Moreli

Programa de Pós -Graduação em Ciência
Aplicadas à Saúde – PPGCAS, Instituto
de Ciência Aplicadas à Saúde – ICS –
Universidade Federal de Jataí – UFJ

RESUMO: As doenças infecciosas virais representam uma das maiores ameaças no mundo globalizado. Estima-se que, anualmente, sejam registrados entre 100 e 300 milhões de casos de infecções virais, dos quais mais de 80% não são diagnosticados ou são considerados clinicamente irrelevantes. Entre essas doenças, a dengue, causada pelo vírus da dengue (DENV), um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, destaca-se como a infecção viral transmitida por mosquitos mais prevalente atualmente. O DENV compreende quatro sorotipos, cada um associado a uma ampla gama de manifestações clínicas, desde febre leve até dengue hemorrágica, uma condição

potencialmente fatal. Contudo, a detecção precoce da infecção pelo DENV ainda representa um desafio significativo. Neste capítulo, abordamos os avanços recentes nos métodos de diagnóstico do DENV, começando por técnicas convencionais, como os ensaios baseados em ácidos nucleicos, métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) e abordagens sorológicas. Em seguida, exploramos as inovações na detecção utilizando biossensores eletroquímicos, com ênfase no papel das moléculas de bioreconhecimento, incluindo ácidos nucleicos e anticorpos. Adicionalmente, apresentamos o potencial de técnicas emergentes, como o sistema CRISPR/Cas, e discutimos sua integração com plataformas de biossensores. Por fim, esta revisão destaca as vantagens da abordagem eletroquímica em comparação com os métodos diagnósticos tradicionais, ressaltando sua relevância para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais sensíveis, específicas e acessíveis.

INTRODUÇÃO

A dengue é um sério problema de saúde pública global, afetando cerca de 100 milhões de pessoas a cada ano [1]. Esta infecção é oriunda de um vírus de RNA de fita simples positivo com tamanho genômico de 10,7 kb e cerca de quatro sorotipos antígenicamente distintos (DENV-1–4) que são membros da família *Flaviviridae* [2].

A doença afeta principalmente países de clima tropical e subtropical, sendo atualmente mais comum em áreas mais e menos desenvolvidas. A dengue apresenta uma ampla gama de sintomas, incluindo febre, dor de cabeça e mialgia (Figura 1), muitas vezes sobrepostos a outras doenças febris, tornando difícil diferenciá-los sem técnicas diagnósticas adequadas. No entanto, a dengue pode ocasionalmente se manifestar de forma mais grave, como na febre hemorrágica da dengue (FHD) ou na síndrome do choque da dengue, que apresentam sinais potencialmente fatais como hemorragia, trombocitopenia e vazamento vascular [3,4]

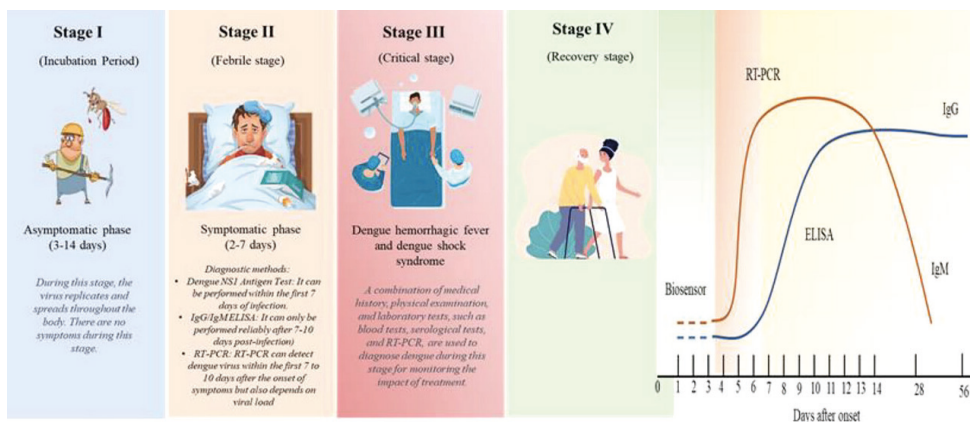


Figura 1. Fases de infecção pelo vírus dengue (Estágio I- período de incubação, fase assintomática -3 a 14 dias), Estágio II (estágio Febril, 2 a 7 dias), Estágio III (Estágio crítico, dengue hemorrágica ou síndrome do choque da dengue), e Estágio IV (estágio de recuperação). Na figura também é mostrado o gráfico com os principais testes como RT-PCR, ELISA e atuação dos biosensores que viriam antes destes testes para a detecção do vírus e previamente ao aparecimento dos anticorpos IgG e IgM.

A imunidade inata e adaptativa são componentes importantes para os mecanismos de defesa contra o DENV. O DENV infecta as células dendríticas residentes nos tecidos, conhecidas como células de Langerhans, e viaja através do sistema linfático para as regiões dos linfonodos exibindo os antígenos virais em sua superfície, desencadeando tanto e respostas imunes adaptativas. As células da imunidade inata são as primeiras a responder através do uso do reconhecimento de padrões receptor específico para infecções por DENV, como gene I citoplasmático induzível por ácido retinóico, receptor toll-like endossomal 3 (TLR3) e TLR7 induzindo respostas de interferon tipo 1 [5].

A resposta imune adaptativa é desencadeada quando o vírus antígenos são apresentados na superfície das células T e B. As células B respondem produzindo anticorpos chamados IgM e IgG que reconhece e neutraliza especificamente a dengue partículas virais. As células T, como T citotóxicas e T assassinas células, reconhecem e matam as células que estão infectadas com o DENV [6]

A identificação precoce dos casos de dengue é essencial para iniciar o tratamento oportuno, prevenir complicações graves, e implementar medidas eficazes de controlo de vectores. Focados métodos de diagnóstico visam melhorar a precisão, velocidade e custo-benefício do diagnóstico da dengue, auxiliando na saúde prestadores de serviços na tomada de decisões informadas sobre o paciente cuidados e intervenções de saúde pública [7]. A infecção por DENV pode ser verificada usando anticorpos, vírus RNA, antígenos ou vírion [8,9]. A infecção geralmente é confirmada durante o período agudo das doenças (primeira semana após início dos sintomas) pela identificação do vírus nas células cultura [10]. Como a capacidade de resposta da separação viral e a reatividade do antígeno diminui nos últimos estágios da doença, os testes sorológicos são cada vez mais utilizados e indicados para identificação [11,12].

As técnicas para detecção do antígeno viral (não estrutural 1 [NS1]) são rápidas, precisas e simples usar, mas eles são incapazes de distinguir entre vários sorotipos virais [13]. A abordagem diagnóstica mais confiável é o isolamento viral, mas leva muito tempo e é bastante desafiador em comparação com a detecção viral direta alternativa procedimentos [14]. Em oposição a isso, o popular processo reverso método de reação em cadeia da polimerase de transcrição (RT-PCR) permite a rápida identificação de genes virais com baixo copiar números em apenas 48 horas [15]. RT-PCR tem muito tempo tem sido um método confiável e rápido para detecção de RNA, particularmente no estudo da presença viral da dengue.

Apesar de sua eficácia, falsos positivos podem surgir de erros no primer design ou hibridização inespecífica sob diferentes PCR condições. Além disso, o processo de amplificação, sendo desafios demorados, dispendiosos e intrincados [16]. Consequentemente, os pesquisadores exploraram biossensores como uma tecnologia alternativa promissora para detecção de DENV e anticorpos contra dengue. Esta abordagem apresenta inúmeras benefícios, incluindo maior sensibilidade, eficiência de custos,

construção descomplicada, potencial para miniaturização, resultados rápidos com análise quantitativa e a viabilidade do monitoramento no local [17].

Esta revisão resume as identificações desenvolvidas de dengue desde técnicas comumente usadas (abordagens baseadas em ácido nucleico, baseadas em PCR e sorológicas) até novas biossensores. O estudo fornece uma extensa investigação sobre projetos atuais e metodologias de fabricação envolvidas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos (baseados em ácido nucleico, baseados em sistema imunológico e baseados em lectina) para detecção precoce de dengue.

ESTRUTURA DOS FLAVIVIRUS DENGUE

DENV tem uma superfície relativamente lisa, de cerca de 40–60 nm dimensionalmente e compreende proteína do nucleocapsídeo de 25–30 nm revestido por bicamada de lipídios (Figura 2) [18].

DENV é um vírus com genoma de RNA de fita simples de sentido positivo (+) que é transcrito em proteínas imediatamente [19,20]. Os subtipos de DENV compartilham cerca de 65% das sequências inteiras de aminoácidos [21]. O genoma completo tem 11 kb de comprimento e codificam sete proteínas: três estruturais (proteína E, proteína C e proteína M) e quatro não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas estruturais são a proteína E, a proteína C e a proteína M, enquanto as proteínas não estruturais são NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 [22,23].

DENV também contém duas regiões terminais 5' e 3' não traduzidas no genoma [24,25]. O vírus contém três domínios que se comunicam com a célula hospedeira na maioria das vezes. A proteína envelope/E tem 4 domínios e 495 aminoácidos, a maior parte dos quais interage com a célula hospedeira [26].

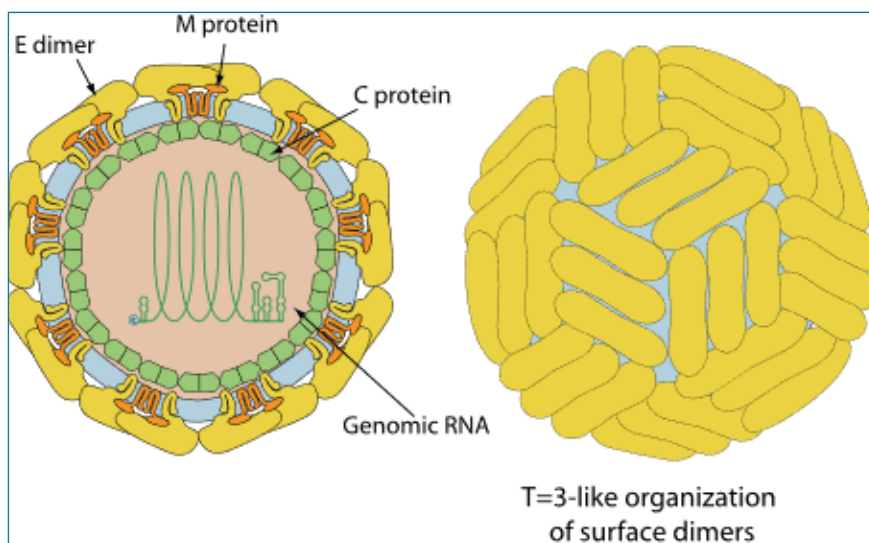


Figura 2. Representação esquemática de partículas dos Flavívirus mostrando a proteína E (E dimer) a proteína do Capsídeo (C protein) e proteína precursora (M proteína) e o RNA genômico (RNA genômico).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE (DENV)

Para o diagnóstico e compreensão da progressão da Infecções por DENV, as detecções de anticorpos IgM e IgG são indicadores valiosos. Anticorpos IgM são detectáveis 4–5 dias após a infecção e são detectáveis por aproximadamente 12 semanas. Isto torna o IgM útil na detecção de doenças agudas. infecção, pois sua existência indica uma infecção contínua. Em contraste, os anticorpos IgG são apresentados como um secundário resposta a antígenos pré-formados durante a infecção primária e permanecem no corpo por um longo período de tempo. IgG indica uma especificidade imunológica para determinado DENV sorotipos e infecção passada. Nos casos em que tanto IgM quanto anticorpos IgG estão presentes durante o diagnóstico de DENV, adistinção entre condição aguda e infecção passada é com base na proporção IgM:IgG [27]. Quanto maior a proporção IgM:IgG confirma as infecções primárias. Outros métodos de diagnóstico, como o teste do antígeno NS1, pode ser realizada nos primeiros 7 dias após a infecção. A detecção de DENV é um aspecto crítico no manejo da infecção por dengue. Métodos mais avançados de detecção, como RT-PCR, pode detectar o material genético do DENV nos primeiros 7 a 10 dias após o início dos sintomas e são cada vez mais utilizados para o diagnóstico da dengue. A precisão do RT-PCR depende do carga viral. A detecção apropriada de DENV é crucial para identificações precoces e estimula o início do tratamento, o que pode ajudar a prevenir complicações graves e reduzir o risco de mortalidade. No entanto, a introdução de técnicas emergentes, como o sistema CRISPR/Cas e sua integração com plataformas de biossensor resultou em avanços no diagnóstico. O desenvolvimento de novos e métodos avançados de diagnóstico continuam a ser um importante área de pesquisa no manejo da infecção por dengue.

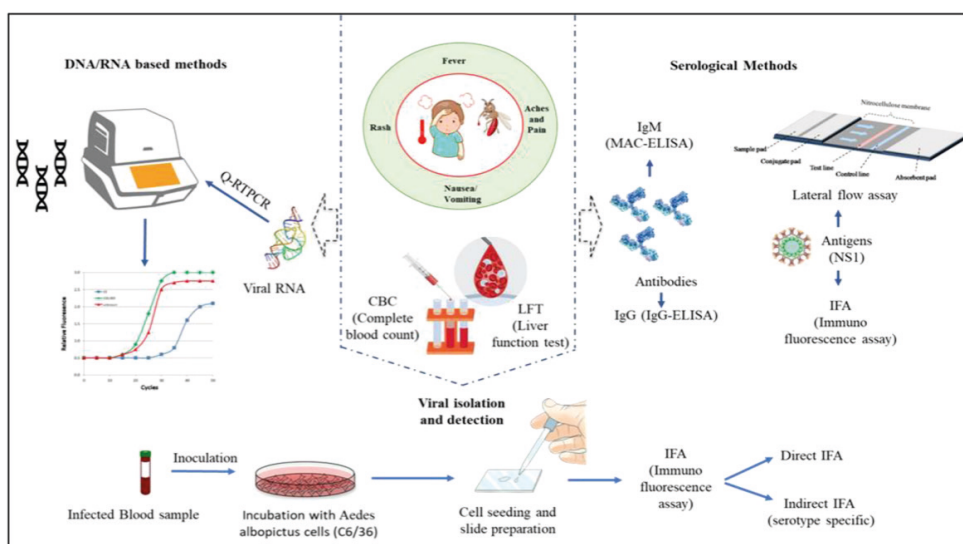


Figura 3. Representação esquemática dos métodos convencionais para a detecção de infecção pelos vírus dengue usando varias técnicas (métodos baseados em RNA/DNA, Isolamento viral, MAC-ELISA, Imunofluorescência (IFA) e detecção de NS1 para o vírus dengue.

BIOSSENSOR DE BASE ELETROQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE DENGUE

Os biossensores são plataformas muito precisas e conscientes que pode detectar até mesmo uma quantidade muito pequena de analitos, possibilitando um diagnóstico precoce que é crucial para limitar a propagação de surtos de doenças. É feito composto por um transdutor com um componente de reconhecimento biológico e um componente elétrico que amplifica os sinais. A resposta é avaliada em termos de corrente, impedância, e possíveis mudanças em biossensores eletroquímicos. Para a detecção do DENV, muitos biossensores eletroquímicos foram desenvolvidos recentemente e estão detalhados a seguir.

Biossensores baseados em ácidos nucleicos

Nos biossensores da dengue, fragmentos de ácido nucleico são tipicamente usados como elementos de biorechecimento. Funciona procurando bases complementares que correspondem ao analito de interesse com sequência de ácido nucleico imobilizada [28]. Uma recente conquista na criação de genossensores usando nanotecnologia proporcionou um novo canal para monitorar o analito. Uma substância que pode ser medida é chamada de analito. Genosensor é um gene ou biossensor baseado em DNA que reconhece moléculas usando sondas de DNA no superfície do sensor especifica a afinidade precisa de fixação entre eles. As interações mais prevalentes são entre proteínas-moléculas de ligante, DNA-RNA ou DNA-DNA. Singhal et al. demonstraram um genosensor baseado em ZnO/platina-substrato de vidro ITO modificado por paládio com DNA de sondagem comum a todos os quatro sorotipos de dengue imobilizados no superfície do eletrodo para a detecção da sequência de DNA de consenso DENV com azul de metileno (MB) como redox

Indicador [29]. A resposta eletroquímica foi examinada usando voltametria cíclica (CV) e pulso diferencial voltametria (DPV). A plataforma revelou um LOD de 4,3 μM . Da mesma forma, um biossensor baseado em controle de porta molecular foi desenvolvido para identificação da dengue [30]. Aqui, a nanolitografia foi usada para projetar nanofios de silício, e o a superfície foi estimulada por procedimentos trifásicos; como hibridização, imobilização de DNA e modificação de superfície. Todas essas etapas se comportam como um canal molecular para criar a identificação elétrica para alvos de base de 27 meros do oligômero de DNA da dengue. Este DNA baseado em oligômero sensor ilustrou um LOD de 2 fM com a capacidade de resposta de 45 $\mu\text{A}/\text{M}$. O grafeno está sendo usado para aumentar a capacidade de resposta, baixo LOD e equilíbrio persistente em um DNAplataforma de detecção durante as últimas duas décadas, e tornou-se um material proeminente em biossensores eletroquímicos. Um biossensor de DNA baseado em grafite foi desenvolvido para identificar o sorotipo DENV-3 [31].

A sonda de DNA com um 22-sequência conservada mer foi escolhida devido ao seu reconhecimento do envelope (gene E, que é responsável por anexar fusão com a membrana da célula hospedeira). Um lápis-grafite eletrodo foi usado para imobilizar a sonda. O DPV foi usado analisar a resposta eletroquímica entre DENV-3 sonda de DNA e a sequência complementar do DENV-3. O LOD foi observado como sendo 3,09 nM

Devido às suas características como fácil síntese, estabilidade química, alta área superficial e detecção de biomoléculas via interatividade com moléculas agressivas, alumina anodizada nanoporosa foi amplamente utilizada em biossensores, por exemplo, eletrodos de alumina e fio de platina nanoporoso cujas sondas de DNA marcadas com 5' são usadas em identificação eletroquímica de DENV. Uma fita simples sequência complementar de 31 mer de DENV-1 e DENV-3 foi selecionado como analito alvo. O biossensor sugerido tem um LOD ultrasensível de $9,55 \times 10^{12}$ M [32]. Uma política de detecção de camada desagregada construída em um alumínio anódico camada de óxido, e a sequência da sonda de DNA também foi usada na identificação do DNA do DENV. Detecção de mudanças dentro dos nanoporos na ligação ao DNA foi realizada por ajuda da espectroscopia de impedância eletroquímica; em qual RP (resistência aos poros) aumenta diretamente em concentrações variadas de DNA na faixa de 1×10^{12} – 1×10^{-6} M com LOD de $2,7 \times 10^{-12}$ M de analito complementar de 31-mer. As sequências complementares das sequências alvo com incompatibilidade de 21 bases e incompatibilidade de base única foram escolhidos separadamente por este biossensor [33]. Eletrodos interdigitados ganharam popularidade recentemente como uma estrutura capacitiva para detecção, pois são mais eficazes em alcançar propriedades dielétricas. A fotolitografia é usada para fabricar superfícies dos eletrodos. Os eletrodos interdigitados detectam os impulsos elétricos produzido por materiais sensores. Um biossensor desagregado para identificação de DNA de DENV-2 foi construído [34]

Nanopartículas de liga quaternária $\text{Cu}_2\text{CdSnS}_4$ foram sintetizadas e colocadas em um substrato de silício gravado com oxigênio (O_2/Si) [34]. Aqui, a liga quaternária funciona como uma plataforma para a imobilização de sondas de DNA específicas para DENV. O biossensor desenvolvido identificou concentrações de ssDNA variando de 100 fM a 10 nM usando análise amperométrica, tendo LOD de 17 nM e sensibilidade de $24,2 \mu\text{A nM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Identificação eletroquímica assistida por nanomateriais de A hibridização de DNA tem um efeito incomum na medicina áreas [35]. Por exemplo, um LOD muito 120×10^{-21} M com a identificação linear varia entre 1 nM e 1 μM foi revelado pela identificação zeta-molar do primer de consenso da dengue pela plataforma eletroquímica usando nanofibras semicondutoras de óxido de manganês (III) eletrofiadas para identificação de hibridização de DNA [35]. A Figura 5 mostra que as técnicas avançadas de detecção de DNA para a detecção abrangente de DENV incluem coleta de amostras, extração de RNA do vírus, fabricação de plataforma de biossensor e detecção através de técnicas como amperometria, seguido pela análise dos resultados.

Imunossensor para o vírus dengue

Linfócitos B e células plasmáticas, dois subtipos diferentes das células sanguíneas, produzem proteínas séricas conhecidas como anticorpos. É criado em contraste com o imunógeno, que é um antígeno que causa uma reação imunológica. Em imunossensores eletroquímicos, o antígeno ou anticorpo serve como elemento de bioreconhecimento em conjugação com transdutores eletroquímicos. Até o momento, vários métodos eletroquímicos baseados em imunossensores foram desenvolvidos devido à sua excelente especificidade, afinidade e sensibilidade [36]. Na maioria dos imunossensores, ligações biotina-estreptavidina [37] ou polímeros condutores por meio de ligação covalente [38] são os métodos de imobilização mais comuns. Recentemente, um DENV biossensor usando Ig de dengue, glicoproteína DENV-2 (NS1), foi relatado [16]. O CNT foi usado para criar o biossensor eletrodo, enquanto polipirrol e N-hidroxissuccinimida Filme 11-(pirrol-1-il) foi usado para imobilizar os anticorpos (Figura 4)

Uma boa plenitude em uma grande faixa de concentração (10^{-13} – 10^{-5} g mL⁻¹) foi revelado tanto pela análise quanto pela EIS. Como vários métodos, o ácido 4-mercaptobenzóico (MBA)-nanopartículas modificadas foram usadas em monocamadas de cisteína automontadas com DENV Ig como plataforma de detecção [39]. Anticorpos anti-DENV foram imobilizados formando ligação covalente no grupo amino a partir de resíduos de aminoácidos e grupo carboxílico do MBA. O estudo CV certificou um potencial para identificar quatro sorotipos de dengue DENV-1–4, respectivamente. Enquanto isso, o desempenho do biossensor foi monitorado através da troca de transferência de carga resistência (ΔR_{CT}). Os resultados mostraram um melhor grau de conexão e proporcionaram boa interatividade entre antígenos e anticorpo para todos os imunossensores de DENV. Correspondentemente, a dependência linear do ensaio clínico randomizado (RCT) versus concentrações de vírus variaram entre 1 e 2×10^3 pfu mL⁻¹ DENV com LOD de 0,12 pfu mL⁻¹ foi relatado a partir dos compósitos de matriz polimérica / grafeno imunossensor de óxido para todos os sorotipos de DENV [40]. Em outros trabalho, o anti-NS1 foi imobilizado em um auto-montado misto monocamada composta por ácido 11-mercaptoundecanóico para fixação anti-NS1 e 6-mercaptohexanol como espaçador a partir do qual um imunossensor impedimétrico sem rótulo baseado em eletrodo de ouro modificado anti-NS1 foi projetado para identificação de viremia no diagnóstico de dengue. Um sensor eletroquímico de dengue sem etiqueta com o duplo

fabricante para quantificação rápida e sensível de NS1 e IgG foi desenvolvido. Eles usaram uma camada única automontada incluindo porções de PEG e um tiol redox amarrado, e ambos os marcadores são identificáveis em torno de relevância policlínica estágios em segundos sem qualquer dano ao padrão sistêmico como linearidade, sensibilidade e variância.

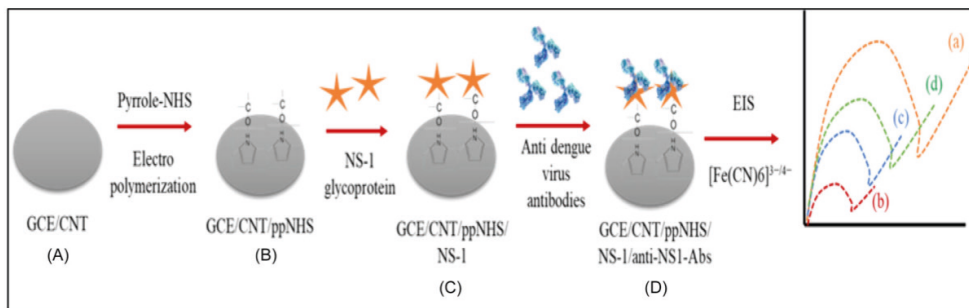


Figura 4. Um biossensor impedimétrico para a detecção de anticorpos anti-dengue em amostras de soro de pacientes usando approach livre de marcação.

O Estado de Arte de Biossensores CRISPR/CAS

A detecção de dengue baseada em CRISPR é uma ferramenta poderosa e método sensível para detectar DENV em uma amostra. Essa abordagem usa a especificidade do sistema CRISPR-Cas para direcionar e detectar a presença de material genético de DENV em uma amostra. Este método demonstrou alta precisão e sensibilidade e pode detectar DENV em ambas as amostras de sangue e saliva. Além disso, o sistema baseado em CRISPR abordagem é relativamente simples e econômica, tornando-se uma ferramenta valiosa para a rápida detecção da dengue em configurações com recursos limitados.

Para usar o sistema CRISPR/Cas para diagnóstico, ele deve ser combinado com outras técnicas de medição, como sequenciamento de DNA, fluorescência, imunocromatografia e eletroquímica. A maioria dos ensaios baseados em CRISPR/Cas requerem uma etapa de pré-amplificação para sensibilidade picomolar, mas isso aumenta a duração e o tempo de resposta do ensaio. Os sensores eletroquímicos CRISPR não requerem pré-amplificação e possuem alta sensibilidade e LODs na faixa femtomolar. Essas plataformas eletroquímicas são rápidas, sensíveis e com baixo LOD [41, 42].

No desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para detecção de dengue, vários sistemas CRISPR, incluindo Cas13 e Cpf1, foram utilizados (Figura 5). Cpf1 oferece uma vantagem sobre Cas13, pois não precisa de sequências PAM para reconhecimento e clivagem do DNA alvo, mas ainda mantém a capacidade de realizar atividade de transclivagem [43].

Em um estudo recente, os pesquisadores projetaram um eletroquímico biossensor baseado na reação CRISPR que pode multiplicar o sinal fundindo MB e AuNPs sem a necessidade para uma etapa de amplificação do nucleotídeo alvo [44]. O alvo ácido nucleico ativa o complexo CRISPR/Cpf1, que leva a uma degradação dos MB-AuNPs imobilizados em o eletrodo de trabalho via SH-ssDNA-biotina. Isso resulta na diminuição do sinal eletroquímico dos MB-AuNPs. A voltametria de onda quadrada foi usada para confirmar a detecção de alvos altamente sensível, que é uma abordagem mais delicada

e confiável. Os MB-AuNPs servem como papel em que o sinal pode facilmente ser favorito devido ao grande quantidade de MB nos AuNPs e a conexão com o SH-ssDNA-biotina. O sistema de detecção assistido por AuNP demonstrou seu potencial como um agente altamente sensível e rápido estratégia de detecção, gerando uma eletroquímica aprimorada de sinal em comparação com uma única sonda molecular MB e medindo baixas concentrações de RNA de DENV-4 tão baixas quanto 100 fM em 30 min. Em um estudo recente, a sensibilidade da eletroquímica a detecção foi aprimorada com o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a identificação do DENV usando o sistema CRISPR/Cas13a [45]. A proteína Cas13a, um Classe II, efetor Tipo VI, tem como alvo sequências específicas de RNA e cliva tanto a sequência alvo quanto a sequência não-alvo próximas sequências, como DNA ou RNA marcado com um fluoróforo ou corante redox [46]. Este processo amplifica significativamente os sinais no biossensor, resultando em aumento sensibilidade e precisão na detecção de DENV. A aplicação de CRISPR/Cas13a em tecnologia de biossensor tem o potencial de revolucionar o campo do diagnóstico. Um novo método de biossensor eletroquímico foi projetado para a identificação de DENV [47]. A abordagem aproveita a especificidade e a capacidade de clivagem do Sistema CRISPR/Cas13a e a processabilidade de um swing caminhante de DNA de braço (DW). O método começa com a hibridização de uma molécula de RNA repórter com o DW, que é então co-imobilizado com um grande número de moléculas de gancho 1 (H1) em uma superfície de eletrodo de ouro. Na presença do alvo DENV-1, o sistema CRISPR/Cas13a é ativado e cliva o RNA repórter, liberando o DW. Este DW liberado atua como um iniciador para um gancho catalítico processo de montagem na superfície do eletrodo, envolvendo a abertura de moléculas H1 imobilizadas e a hibridização de moléculas hairpin 2 (H2-Fc) marcadas com ferroceno. Esse leva à captura de um grande número de H2-Fc no eletrodo, resultando em um sinal eletroquímico amplificado que é proporcional à quantidade de DENV-1 alvo presente na amostra. Este método eletroquímico baseado em CRISPR/DW oferece alta precisão, sensibilidade e custo-benefício, tornando-o um dispositivo perfeito para o rápido identificação de DENV em ambientes com recursos limitados. O sensibilidade do eletroquímico baseado em CRISPR/DW biosensing [44,45]. método para detecção de DENV foi determinado como estando na faixa de 5 fM a 50 nM, com LOD de 0,78 fM. Essa sensibilidade está entre as maiores relatadas na literatura, demonstrando o papel efetivo do método em importância diagnóstica clínica. A sensibilidade relatada e LOD indicam que o método é capaz de detectar níveis extremamente baixos do vírus alvo, tornando-o um ferramenta valiosa para diagnóstico precoce e preciso de infecções DENV.

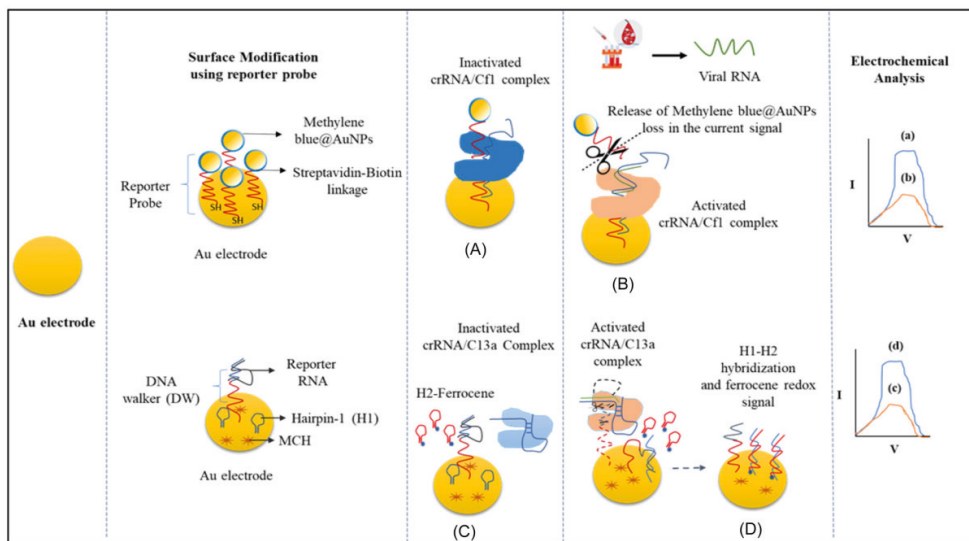


Figura 5. Ilustração esquemática de abordagens baseadas em sensores de DNA baseadas em CRISPR/Cas desenvolvidas para detecção em estágio inicial de dengue RNA do vírus (DENV)

AVANÇOS NO BIOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA O VÍRUS DENGUE

O tratamento das cepas de DENV é mais importante ciente sobre a conduta de desenvolvimento do vírus também como infecções. Os diagnósticos economicamente disponíveis incluem antígeno solúvel específico de DENV, detecção de RNA viral, um Ig específico para dengue. Nos estágios iniciais da dengue (dentro de 5 dias após a doença), o RT-PCR é usado para avaliar o DENV RNA viral e sorotipagem por PCR multiplex específico do tipo. Considerando que a presença de infecção por DENV em amostras de sangue é avaliada por IgM anti-dengue. Em muitos casos, o diagnóstico da infecção por dengue é iniciado por PCR, sorologia testes ou cultura do vírus. Isolamento e crescimento eficazes do vírus requer soro de um paciente grave no qual uma quantidade suficiente de vírus foi coletada dentro de um algumas horas antes do início da febre. Além disso, estas abordagens exigem laboratórios de nível 3 de biossegurança com instrumentos de laboratório, produtos químicos e especialistas caros, por isso exigem muito tempo e mão-de-obra. Avaliação por Os métodos RT-PCR causam problemas e falsos positivos devido às diferenças nas cepas de DENV. Em qualquer caso, o PCR inibidores como antibióticos e hemoglobina fornecerão redução na capacidade de resposta devido à fusão entre DNA polimerase e DNA. A PCR só pode ser usada para identificar DENV em estágio prematuro de suas infecções, e é inadequada após 5–7 dias. Em testes de detecção de anticorpos (abordagens sorológicas), os anticorpos como IgM, IgG, e NS1 são diagnosticados a partir de fluidos corporais ou soro. Resposta incorreta em testes de detecção de anticorpos; usando IgG e IgM apresentou forte reatividade cruzada com anticorpos contra outros flavivírus co-

transmitidos como resultado de infecção ou vacinação. Em contrapartida, o teste ELISA é rápido e barato, embora exija avaliação de soros de fase aguda e convalescente pareados para confirmar uma infecção positiva por DENV. Todas as técnicas convencionais são seja caro, trabalhoso, envolva tempo protocolo de preparação de amostras e exigem um sofisticado instalação de infraestrutura.. Até o momento, os biossensores eletroquímicos são barato, fácil de usar, requer pouca preparação de amostra tempo e usar dispositivos totalmente informatizados e portáteis

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Há vinte anos, as técnicas de biosensor fizeram avanços significativos na identificação de doenças infecciosas. microorganismos, abrindo implicações positivas para diagnóstico de doença futura. Este capítulo baseado nos artigos fornece uma extensa esboço da identificação eletroquímica do DENV. Nesta revisão, vários pontos de vista abrangentes sobre tecnologia de biosensor eletroquímico, síntese, design, e as suposições fundamentais sobre a transdução foram demonstrado. Além disso, foi feita uma tentativa ilustrar com exemplos os vários processos eletroquímicos técnicas de biosensor usadas para diagnóstico de DENV. Correspondentemente, o significado dos elementos de bioreconhecimento em Biossensor DENV e vários tipos de biossensores de base biológica assuntos usados no sensor foram discutidos. Até embora o biossensor eletroquímico DENV tenha feito progressos consideráveis, ainda são necessários mais avanços que poderia melhorar a eficácia dos biossensores. Certo agora, a barreira para o biossensor é a falta de compreensão elementar da molécula de bioreconhecimento, que é crucial para aplicações de biossensor de alto rendimento

REFERÊNCIA

- (1). Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 2002;10(2):100–103.
- (2). Neufeldt CJ, Cortese M, Acosta EG, Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat Rev Microbiol.*;16(3):125–42. 2018
- (3). Singhi S, Kissoon N, Bansal A. Dengue e dengue hemorrágico: aspectos do manejo na unidade de terapia intensiva. *J Pediatr.*;83(2):S22–S35. 2007
- (4). Wang W-H, Urbina AN, Chang MR, Assavalapsakul W, Lu P-L, Chen Y-H, et al. Dengue hemorrhagic fever—a systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. *J Microbiol Immunol Infect.*;53(6):963–78. 2020
- (5). Lee MF, Voon GZ, Lim HX, Chua ML, Poh CL. Innate and adaptive immune evasion by dengue virus. *Front Cell Infect Microbiol.* 12:1004608. 2022;

- (6). Uno N, Ross TM. Dengue virus and the host innate immune response. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):1–11.
- (7). Pang J, Chia PY, Lye DC, Leo YS. Progress and challenges towards point-of-care diagnostic development for dengue. *J Clin Microbiol.*;55(12):3339–49. 2017
- (8). Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. Modulation of dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol.*;74(11):4957–66. 2000
- (9). Jaiswal S, Smith K, Ramirez A, Woda M, Pazoles P, Shultz LD, et al. Dengue virus infection induces broadly cross-reactive human IgM antibodies that recognize intact virions in humanized BLT-NSG mice. *Exp Biol Med.*;240(1):67–78. 2015
- (10). de Oliveira Poersch C, Pavoni DP, Queiroz MH, de Borba L, Goldenberg S, dos Santos CN, et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *J Clin Virol.*;32(4):272–77. 2005
- (11). Ohst C, Saschenbrecker S, Stiba K, Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, et al. Reliable serological testing for the diagnosis of emerging infectious diseases. *Adv Exp Med Biol.*;1062:19–43. 2018
- (12). Tai D-F, Lin C-Y, Wu T-Z, Huang J-H, Shu P-Y Artificial receptors in serologic tests for the early diagnosis of dengue virus infection. *Clin Chem.*;52(8):1486–91. 2006
- (13). Lai S-C, Huang Y-Y, Shu P-Y, Chang S-F, Hsieh P-S, Wey J-J, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of dengue virus (DENV) NS1 and differentiation of DENV serotypes during early infection. *J Clin Microbiol.*;57(7):e00221–e00219. 2019
- (14). Muller DA, Depelsenaire ACI, Young PR. Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. *J Infect Dis.*;215(2):S89–S95. 2017
- (15). Songjaeng A, Thiemmecca S, Mairiang D, Punyadee N, Kongmanas K, Hansuealueang P, et al. Development of a singleplex real-time reverse transcriptase PCR assay for pan-dengue virus detection and quantification. *Viruses.*2022;14(6):1271.
- (16). Anusha JR, Kim BC, Yu K-H, Raj CJ. Electrochemical biosensing of mosquito-borne viral disease, dengue: a review. *Biosens Bioelectron.* 2019;142:111511.
- (17). Ferreira PC, Ataíde VN, Silva Chagas CL, Angnes L, Tomazelli Coltro WK, Longo Cesar Paixão TR, et al. Wearable electrochemical sensors for forensic and clinical applications. *TrAC Trends Anal Chem.* 2019;119:115622.
- (18). Kabir MA, Zilouchian H, Younas MA, Asghar W. Dengue detection: advances in diagnostic tools from conventional technology to point of care. *Biosensors.* 2021;11(7):206.
- (19). Warncke SR, Knudsen CR. Detection methods targeting the positive- and negative-sense RNA transcripts from plusstranded RNA viruses. *APMIS.* 2022;130(5):284–92.
- (20). Mackenzie J. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* 2005;6(11):967–77.

- (21). Parameswaran P, Charlebois P, Tellez Y, Nunez A, Ryan EM, Malboeuf CM, et al. Genome-wide patterns of intrahuman dengue virus diversity reveal associations with viral phylogenetic clade and interhost diversity. *J Virol.* 2012;86(16):8546–58.
- (22). Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(4):369–77.
- (23). Bhatnagar P, Sreekanth GP, Murali-Krishna K, Chandele A, Sitaraman R. Dengue virus non-structural protein 5 as a versatile, multi-Functional effector in host–pathogen Interactions. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:574067.
- (24). Nasar S, Rashid N, Itikhar S. Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective antidengue treatment: a review. *J Med Virol.* 2020;92(8):941–55.
- (25). Song Y, Mugavero J, Stauff CB, Wimmer E. Dengue and *Zika virus* 5′ untranslated regions harbor internal ribosomal entry site functions. *mBio.* 2019;10(2):e00459–e00419.
- (26). Askov J, Buzacott K, Thu HM, Lowry K, Holmes EC Longterm transmission of defective RNA viruses in humans and *Aedes* mosquitoes. *Science* (80–), 2006;311(5758):236–38.
- (27). Nagar PK, Savargaonkar D, Anvikar AR Detection of dengue virus-specific IgM and IgG antibodies through peptide sequences of envelope and NS1 proteins for serological identification. *J Immunol Res.* 2020;2020:1–8.
- (28). Kwakye S, Baeumner A A microfluidic biosensor based on nucleic acid sequence recognition. *Anal Bioanal Chem.* 2003;376(7):1062–68.
- (29). Singhal C, Pundir CS, Narang J A genosensor for detection of consensus DNA sequence of dengue virus using ZnO/Pt-Pd nanocomposites. *Biosens Bioelectron.* 2017;97:75–82.
- (30). Nuzaihan MNM, Hashim U, Md Arshad MK, Kasjoo SR, Rahman SFA, Ruslinda AR, et al. Electrical detection of dengue virus (DENV) DNA oligomer using silicon nanowire biosensor with novel molecular gate control. *Biosens Bioelectron.* 2016;83:106–14.
- (31). Khan MZH, Hasan MR, Hossain SI, Ahommed MS, Daizy M Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: state of the art. *Biosens Bioelectron.* 2020;166:112431.
- (32). Tian G, Ding M, Xu B, He Y, Lyu W, Jin M, et al. A novel electrochemical biosensor for ultrasensitive detection of serum total bile acids based on enzymatic reaction combined with the double oxidation circular amplification strategy. *Biosens Bioelectron.* 2018;118:31–35.
- (33). Rai V, Deng J, Toh C-S Electrochemical nanoporous alumina membrane-based label-free DNA biosensor for the detection of *Legionella* sp. *Talanta.* 2012;98:112–17.
- (34). Odeh AA, Al-Douri Y, Voon CH, Mat Ayub R, Gopinath SCB, Odeh RA, et al. A needle-like Cu₂CdSnS₄ alloy nanostructurebased integrated electrochemical biosensor for detecting the DNA of dengue serotype 2. *Microchim Acta.* 2017;184(7):2211–18.
- (35). Anusha JR, Fleming AT, Kim H-J, Kim BC, Yu K-H, Raj CJ Effective immobilization of glucose oxidase on chitosan submicron particles from gladius of *Todarodes pacificus* for glucose sensing. *Bioelectrochemistry.* 2015;104:44–50.

- (36). Dill K, Montgomery DD, Ghindilis AL, Schwarzkopf KR, Ragsdale SR, Oleinikov AV Immunoassays based on electrochemical detection using microelectrode arrays. *Biosens Bioelectron*, 2004;20(4):736–42.
- (37). Li M, Wong KKW, Mann S Organization of inorganic nanoparticles using biotin–streptavidin connectors. *Chem Mater*, 1999;11(1):23–26.
- (38). Ates M A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers. *Mater Sci Eng, C*, 2013;33(4):1853–59.
- (39). Darwish NT, Sekaran SD, Alias Y, Khor SM Immunofluorescence–based biosensor for the determination of dengue virus NS1 in clinical samples. *J Pharm Biomed Anal*, 2018;149:591–602.
- (40). Navakul K, Warakulwit C, Yenchitsomanus P, Panya A, Lieberzeit PA, Sangma C A novel method for dengue virus detection and antibody screening using a graphene-polymer based electrochemical biosensor. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*. 2017, 13(2):549–57..
- (41). Kaminski MM, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Zhang F, Collins JJ CRISPR-based diagnostics. *Nat Biomed Eng*, 2021;5(7):643–56.
- (42). Hajian R, Balderston S, Tran T, deBoer T, Etienne J, Sandhu M, et al. Detection of unamplified target genes via CRISPR–Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nat Biomed Eng*, 2019;3(6):427–37.
- (43). Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science* (80–.), 2018;360(6387):436–39.
- (44). Lee Y, Choi J, Han HK, Park S, Park SY, Park C, et al. Fabrication of ultrasensitive electrochemical biosensor for dengue fever viral RNA based on CRISPR/Cpf1 reaction. *Sens Actuators B: Chem*, 2021;326:128677.
- (45). Wang J, Xia Q, Wu J, Lin Y, Ju H. A sensitive electrochemical method for rapid detection of dengue virus by CRISPR/Cas13a-assisted catalytic hairpin assembly. *Anal Chim Acta*, 2021;1187:339131.
- (46). Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* (80–.), 2018;360(6387):439–44.
- (47). Silva MMS, Dias ACMS, Silva BVM, Gomes-Filho SLR, Kubota LT, Goulart MOF, et al. *J Chem Technol Biotechnol*, 2015;90(1):194–200.