



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA - PPGIBA



DANIELE SOUSA MOTA

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS MOLECULARES BASEADOS NO
SISTEMA CRISPR/Cas13a PARA DETECÇÃO DE *Plasmodium vivax***

MANAUS - AM

2024

DANIELE SOUSA MOTA

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS MOLECULARES BASEADOS NO
SISTEMA CRISPR/Cas13a PARA DETECÇÃO DE *Plasmodium vivax***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Doutora em Imunologia na área de concentração “Desenvolvimento de produtos e processos imunobiológicos”.

Orientador: Dr. Luis André Morais
Mariúba

Coorientador: Dr. Walter Ricardo Brito

Coorientadora: Dra. Ariamna María Dip
Gandarilla

MANAUS – AM

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M917d Mota, Daniele Sousa
Desenvolvimento de ensaios moleculares baseados no sistema CRISPR/Cas13a para detecção de Plasmodium vivax / Daniele Sousa Mota . 2024
130 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luis André Morais Mariúba
Coorientador: Walter Ricardo Brito
Coorientadora: Ariamna María Dip Gandarilla
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. CRISPR/Cas13a. 2. P. vivax. 3. diagnóstico. 4. detecção molecular. 5. biossensor eletroquímico. I. Mariúba, Luis André Morais. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese de doutorado à minha mãe **Dinalva Mota**, que me criou com muito amor e dedicação. Obrigada por me incentivar e me apoiar em todos os momentos.*

*Dedico também ao meu orientador, **Luis Mariúba**, que sempre me incentivou e confiou a mim este trabalho.*

*Sobretudo, dedico a **Deus**, que é minha fortaleza e minha fonte de sabedoria.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, por me proteger, abençoar e conceder sabedoria para contornar as situações adversas que surgiram no decorrer desta caminhada.

Ao meu orientador Dr. Luis André Mariúba, por todos os ensinamentos compartilhados, pelo incentivo, amizade, conselhos e apoio ao meu crescimento profissional. E é claro, pela orientação excepcional. Muito obrigada!

À minha coorientadora e amiga Dra. Ariamna Gandarilla, por ter sido fundamental para o desenvolvimento do projeto, compartilhando de bom grado seu conhecimento em eletroquímica, sensores e biossensores.

Ao meu coorientador Dr. Walter Brito, pelos ensinamentos e por disponibilizar prontamente as instalações de seu laboratório.

À minha mãe Dinalva Mota, por todos os ensinamentos que moldaram o meu caráter e por todo o esforço que fez para sempre tentar oferecer o melhor que podia para mim.

Aos meus familiares que sempre torcem e vibram com minhas conquistas e que sempre estão ao meu lado quando preciso.

À minha amiga de pós-graduação Josiane Almeida, pela amizade que cresceu ainda mais com os obstáculos que compartilhamos juntas durante o doutorado. Obrigada por cada palavra de força e encorajamento!

Aos meus professores de doutorado, em especial, à professora Dra. Aya Sadahiro pela orientação no estágio de docência e por contribuir gentilmente pela ampliação do meu entendimento sobre imunologia. Toda minha admiração e carinho.

Aos meus amigos e colegas do laboratório DCIA: Aline, Caio, Jeniffer, Edilene, Késsia e Joyce, pelo convívio amistoso e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos do laboratório LABEL, Claudionor Barbosa e Juliana Maurício, pela amizade e auxílio em alguns experimentos realizados.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pela aceitação e valiosas contribuições para aprimoramento do trabalho desenvolvido.

À secretaria de coordenação do programa de Pós-graduação PPGIBA, Edson, Magda e Ana Paula, pela prontidão e assistência acadêmica no decorrer do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento da pesquisa.

Por fim, ao Instituto Leônidas Maria Diane (FIOCRUZ-Amazônia) pelo suporte físico e apoio institucional.

*“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso!
Não se apavore, nem desanime, pois o Senhor,
o seu Deus, estará com você por onde você andar.”*

Josué 1:9

RESUMO

A malária é considerada um problema de saúde pública global em humanos ao longo de anos, devido a ser uma das principais doenças com maior impacto na morbidade e mortalidade em muitos países tropicais e subtropicais. Os métodos mais comumente usados para o diagnóstico da malária são o exame microscópico, testes de diagnóstico rápido e reação em cadeia da polimerase, ferramentas limitadas pelo conhecimento técnico envolvido, menor sensibilidade e elevado custo de reagentes e equipamentos. Diante disso, há necessidade de desenvolver ferramentas que facilitem o diagnóstico de malária, em específico a espécie *Plasmodium. vivax*, de forma mais rápida e de simples execução em postos de atendimento (POC) por agentes de saúde. Os biossensores eletroquímicos inserem-se no cenário clínico como promissoras alternativas analíticas para o diagnóstico em POC. Desta forma, os objetivos centrais deste estudo foram o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado no sistema CRISPR/Cas13a, empregando eletrodos impressos de carbono modificados com estreptavidina (SPCE/STV), além da detecção de amostras clínicas de *P. vivax* por meio do ensaio de fluorescência baseado no sistema CRISPR/Cas13a. A proteína Cas13a foi expressa e purificada e a sequência de crRNA foi projetada para reconhecer um fragmento do gene *pvm-dr-1*. Para o desenvolvimento do biossensor eletroquímico, foi projetado um oligonucleotídeo sintético ssDNA/ssRNA com presença de uma biotina, o qual foi imobilizado na superfície dos SPCE/STV para a posterior detecção molecular. As medidas eletroquímicas foram conduzidas por voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica. Como resultado, o teste CRISPR/Cas13a por fluorescência apresentou um bom desempenho em ambiente clínico. Das 30 amostras positivas, 27 apresentaram resultados positivo com o método, demonstrando uma sensibilidade clínica considerável. Das 20 amostras negativas analisadas, o método não detectou a presença de 19 delas, demonstrando uma especificidade aceitável. Além disso, o teste forneceu um limite de detecção de 1,35 pM, apresentando alta sensibilidade. Por sua vez, o biossensor desenvolvido usando o sistema CRISPR/Cas13a mostrou ser específico para o fragmento alvo, sendo registradas mudanças na resposta eletroquímica (aumento de corrente) após a clivagem colateral de Cas13a sobre o oligonucleotídeo imobilizado na superfície do eletrodo. Por outro lado, na ausência do alvo, o perfil voltamétrico não obteve alteração, indicando diferenças entre as amostras positivas e negativas. Como resultados promissores apresentados neste trabalho, os testes moleculares baseados em CRISPR/Cas13a podem fornecer uma abordagem alternativa para identificar infecções por *P. vivax* de maneira fácil e oportuna.

Palavras-Chave: CRISPR-Cas13a; *P. vivax*; diagnóstico; detecção molecular; biossensor eletroquímico.

ABSTRACT

Malaria has been considered a global public health problem in humans for years, due to it being one of the main diseases with the greatest impact on morbidity and mortality in many tropical and subtropical countries. The most used methods for diagnosing malaria are microscopic examination, rapid diagnostic tests and polymerase chain reaction, tools limited by the technical knowledge involved, lower sensitivity and high cost of reagents and equipment. Given this, there is a need to develop tools that facilitate the diagnosis of malaria, specifically the *Plasmodium* species. *vivax*, in a faster and simpler way to be carried out at service centers (POC) by health agents. Electrochemical biosensors are inserted in the clinical scenario as promising analytical alternatives for diagnosis in POC. Thus, the central objectives of this study were the development of an electrochemical biosensor based on the CRISPR/Cas13a system, using printed carbon electrodes modified with streptavidin (SPCE/STV), in addition to the detection of clinical samples of *P. vivax* through the assay fluorescence based on the CRISPR/Cas13a system. The Cas13a protein was expressed and purified, and the crRNA sequence was designed to recognize a fragment of the *pvmdr-1* gene. For the development of the electrochemical biosensor, a synthetic ssDNA/ssRNA oligonucleotide with the presence of biotin was designed, which was immobilized on the surface of SPCE/STV for subsequent molecular detection. Electrochemical measurements were conducted by differential pulse voltammetry and cyclic voltammetry. As a result, the CRISPR/Cas13a fluorescence test performed well in a clinical setting. Of the 30 positive samples, 27 tested positive with the method, demonstrating considerable clinical sensitivity. Of the 20 negative samples analyzed, the method did not detect the presence of 19 of them, demonstrating acceptable specificity. Furthermore, the test provided a detection limit of 1,35 pM, presenting good sensitivity. In turn, the biosensor developed using the CRISPR/Cas13a system proved to be specific for the target fragment, with changes in the electrochemical response (increase in current) being recorded after the collateral cleavage of Cas13a on the oligonucleotide immobilized on the electrode surface. On the other hand, in the absence of the target, the voltammetric profile did not change, indicating differences between the positive and negative samples. As promising results presented in this work, CRISPR/Cas13a-based molecular tests may provide an alternative approach to identify *P. vivax* infections in an easy and timely manner.

Key words: CRISPR-Cas13a; *P. vivax*; diagnosis; molecular detection; electrochemical biosensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa dos países endêmicos da malária..	4
Figura 2: Distribuição de casos de malária confirmados por 1000 habitantes no ano de 2020 na América do Sul.	5
Figura 3: Mapa de risco de malária por município de infecção.	6
Figura 4: Ciclo de vida do Plasmodium.	9
Figura 5: Mecanismo de imunidade adaptativa mediada por CRISPR-Cas em procariontes.	17
Figura 6: Ensaio de detecção do método SHERLOCK.	19
Figura 7: Elementos e componentes de um biossensor típico.	20
Figura 8: Eletrodo impresso de carbono (SPE) comercializado pela empresa Metrohm Dropsens	22
Figura 9: Sinal de excitação proveniente da técnica VC.	24
Figura 10: Esquema de aplicação de potenciais.	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM – Azul de metileno

CAS – Proteína associada a CRISPR

CQ – Cloroquina

CRISPR - Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas com Intervalos Regulares

crRNA – RNA guia

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxinucleotídeo Trifosfato

DO – Densidade óptica

dsDNA – DNA de dupla fita

G6PD – Glicose 6—fosfato desidrogenase

HEPES - Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1

IPA – Incidência Parasitária Anual

IPTG - Isopropílico β -D-1-thiogalactopyranoside

Kb – Quilobase

kDa – Quilodálton

LB – Meio Luria-Bertani

LwaCas13a – *Leptotrichia wadei* Cas13a

Mg - Magnésio

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

mL - Mililitro

mmol L⁻¹ – Milimolar

mRNA – RNA mensageiro

nm - Nanômetro

OLIGO – Oligonucleotídeo

OMS – Organização Mundial da Saúde

P. falciparum - *Plasmodium falciparum*

P. knowlesi – *Plasmodium knowlesi*

P. malariae – *Plasmodium malariae*

P. ovale – *Plasmodium ovale*

P. vivax - *Plasmodium vivax*

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

POC – Configuração de ponto de atendimento

PQ – Primaquina

pvcrt-o - Gene transportador de resistência à cloroquina de *P. vivax*

pvm-dr-1 - Gene transportador de resistência à múltiplas drogas de *P. vivax*

RDT – Teste de diagnóstico rápido

REASSURED – Acessível, sensível, específico, fácil de usar, rápido, sem equipamento, entregue

RNA - Ácido ribonucleico

RPA – Amplificação da Polimerase Recombinante

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SPE – Eletrodo impresso

SPCE/STV – Eletrodo impresso de carbono modificado com estreptavidina

ssDNA – DNA de fita simples

ssRNA – RNA de fita simples

VC – Voltametria cíclica

VPD – Voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Epidemiologia da malária	4
2.2 Ciclo de vida e aspectos clínicos	7
2.2.1 Particularidades do ciclo de vida de <i>P. vivax</i>	10
2.3 Tratamento da malária vivax	11
2.4 Diagnóstico da malária	12
2.4.1 Microscopia de luz.....	12
2.4.2 Testes de diagnóstico rápido (RDTs)	13
2.4.3 Métodos de diagnóstico molecular	14
2.5 Limitações e desafios dos métodos de diagnósticos.....	14
2.6 Sistema CRISPR-Cas.....	16
2.6.1 Diagnóstico baseado em CRISPR-Cas13a	18
2.7 Biossensores	20
2.7.1 Conceitos Gerais.....	20
2.7.2 Biossensores eletroquímicos.....	22
2.7.3 Técnicas voltamétricas.....	23
2.7.3.1 Voltametria Cíclica (VC).....	24
2.7.3.2 Voltametria de pulso diferencial (VPD)	25
2.8 Biossensores eletroquímicos baseados em CRISPR-Cas	26
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. CAPÍTULO 1	31
5. CAPÍTULO 2	73
6. CAPÍTULO 3	91
5 DISCUSSÃO GERAL	107
6 CONCLUSÃO.....	112
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

1. INTRODUÇÃO

A malária é considerada um problema de saúde pública global em humanos ao longo de anos, devido a ser uma das principais doenças com maior impacto na morbidade e mortalidade em muitos países tropicais e subtropicais (OMS, 2021). Segundo o relatório mundial de malária de 2022, mostrou que os casos da doença aumentaram de 245 milhões em 2020 para 247 milhões em 2021 (OMS, 2022). O aumento de casos de malária pode ser justificado pelo declínio na eficácia das ferramentas primárias de detecção, ausência de vacina eficaz, surgimento e disseminação da resistência a medicamentos antimaláricos em parasitas e resistência em populações de *Anopheles* a redes inseticidas (LYIMO et al. 2022; QUANSAH et al. 2023).

Os agentes causadores da malária são parasitas pertencentes ao gênero *Plasmodium*. As espécies de *Plasmodium* que naturalmente infectam humanos e causam malária são limitadas a seis, sendo as infecções mais prevalente por *P. falciparum* e *P. vivax* (OMS, 2019). No Brasil, a transmissão da malária predomina na região amazônica abrangendo cerca de 99% dos casos no país. Em 2020, foram registrados 145.188 casos no Brasil, com total de 118.651 casos notificados causados pela espécie *P. vivax* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Embora as infecções por *P. vivax* sejam consideradas benignas, nos últimos anos tem se observado um padrão incomum de complicações clínicas associadas a infecção por essa espécie. Tais manifestações graves foram relatadas em estudos recentes em diferentes lugares do mundo, como malária cerebral, síndrome respiratória aguda, lesão pulmonar, insuficiência renal, disfunção hepática, icterícia e anemia grave, dentre outras, podendo levar a morte desses pacientes (MEHRIZI et al. 2023).

O diagnóstico preciso e exato é indispensável para o controle e eliminação da malária, especificamente em ambientes com recursos limitados. Atualmente, os métodos de diagnósticos tradicionais baseiam-se na microscopia e nos testes de diagnóstico rápido (RDT). Apesar do curto tempo de resposta, esses métodos possuem grandes limitações. A microscopia e os RDTs são menos sensíveis e incapazes de detectar baixa parasitemia de infecções. Para superar essas limitações, métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) apresentam resultados altamente sensíveis e específicos para identificação de diferentes espécies de *Plasmodium*. No entanto, a alta complexidade e reagentes e equipamentos caros dificultam

a aplicação dessas técnicas em ambientes com poucos recursos (LYIMO et al. 2022; MEHRIZI et al. 2023).

Para superar esses desafios, métodos inovadores de diagnóstico da malária baseados em técnicas moleculares e implantáveis em campo são necessários para o gerenciamento eficaz de casos. A nova tecnologia baseada no sistema CRISPR/Cas tem o potencial de preencher as lacunas existentes no diagnóstico. O sistema repetições palindrômicas curtas regularmente inter espaçadas agrupadas (CRISPR) e a proteína associada ao sistema (Cas) participam do sistema imunológico em bactérias e arqueias para protegê-las contra elementos genéticos estranhos (J. WANG et al. 2022). Os métodos baseados em CRISPR oferecem vantagens promissoras, pois possui sensibilidade e especificidade semelhantes aos ensaios de PCR. Além disso, o sistema de detecção por CRISPR/Cas reduzem a necessidade de grandes equipamentos, que é uma característica notável para implementação em campo (CHAKRABORTY et al., 2022; LYIMO et al. 2022).

A plataforma de detecção de ácidos nucleicos “SHERLOCK” baseada em CRISPR-Cas13a, recentemente desenvolvida por Zhang e colaboradores, mostrou-se promissora na área de saúde diagnóstica. Esta metodologia baseia-se na amplificação isotérmica por RPA com a capacidade funcional de Cas13a para clivar indiscriminadamente RNA (incluindo RNA repórter fluorescente) somente após detectar uma sequência de RNA alvo específica (GOOTENBERG et al., 2017; KELLNER et al., 2019). Muitas das qualidades que o tornam atraente para implantação em campo, incluindo detecção rápida, condição de reação de temperatura única, alta sensibilidade, baixo custo, podem ser realizados usando dispositivos de ponto atendimento, por exemplo, atrelado a biossensores.

Os biossensores são baseados na integração direta de um elemento de bioreconhecimento seletivo e um elemento transdutor sensível, e fornecem plataformas complementares a PCR para identificação e quantificação de patógenos (CASTILLO-HENRIQUEZ et al., 2020). Em comparação com as estratégias de detecção existentes, as técnicas eletroquímicas ocupam uma posição importante nos biossensores atuais, pois são econômicas, fáceis de fabricar, fáceis de funcionalizar e miniaturizar, oferecem sensibilidade e seletividade relativamente altas, além de respostas rápidas (D’ORAZIO, 2003; WILSON, 2005). Juntamente com as vantagens do sistema CRISPR-Cas e das técnicas eletroquímicas, é possível alcançar melhorias significativas no biossensor com amostras biológicas, que geralmente são prejudicadas pela presença de interferentes, resultando em impedimento do

processo de transferência de elétrons e medições subsequentes (PRIYA SWETHA et al., 2021).

Diante do exposto, adotamos testes moleculares baseados no sistema CRISPR-Cas13a aplicados na detecção específica de *P. vivax*. Testes fluorescentes e eletroquímicos combinados a CRISPR/Cas13a pode oferecer uma alternativa viável aos testes de detecção convencionais para auxiliar no diagnóstico de malária em ambientes clínico com baixos recursos. Essas estratégias podem ser expandidas para a detecção de outros alvos, não se restringindo apenas a *P. vivax*, fornecendo assim, ferramentas promissoras para a pesquisa básica e clínica aplicada. O sistema CRISPR-Cas13a combinado com fluorescência ou eletroquímica pode detectar o material genético de *P. vivax* presente na reação de forma específica, rápida e sensível.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia da malária

A malária é considerada um grave problema de saúde pública no mundo, devido ser uma das doenças com maior impacto na morbidade e mortalidade da população de vários países pertencentes a regiões tropicais e subtropicais do planeta (OMS, 2021). A malária é uma doença parasitária com manifestações agudas e é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Das mais de 120 espécies de *Plasmodium* conhecidas, cinco causam infecções por malária em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. No entanto, o *P. falciparum* e *P. vivax* são os principais responsáveis pela doença no mundo. A proporção dessas duas espécies de parasitas varia geograficamente, dependendo em parte da suscetibilidade à infecção de populações específicas (OMS, 2019).

Apesar de ser considerada tratável e apresentar evolução favorável quando ações de saúde efetivas são adotadas, a malária continua sendo uma doença relevante do ponto de vista da saúde global. De acordo com o Relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2022, a taxa de incidência estimada para malária em 2021 era 247 milhões de casos em todo o mundo, com um aumento em relação aos 245 milhões em 2020 (OMS, 2022). O aumento dos casos de malária foi influenciado pela interrupção dos serviços durante a pandemia da COVID-19. As mortes por malária são estimadas em 619.000 em 2021, uma ligeira diminuição em comparação com 2020 (OMS, 2021).

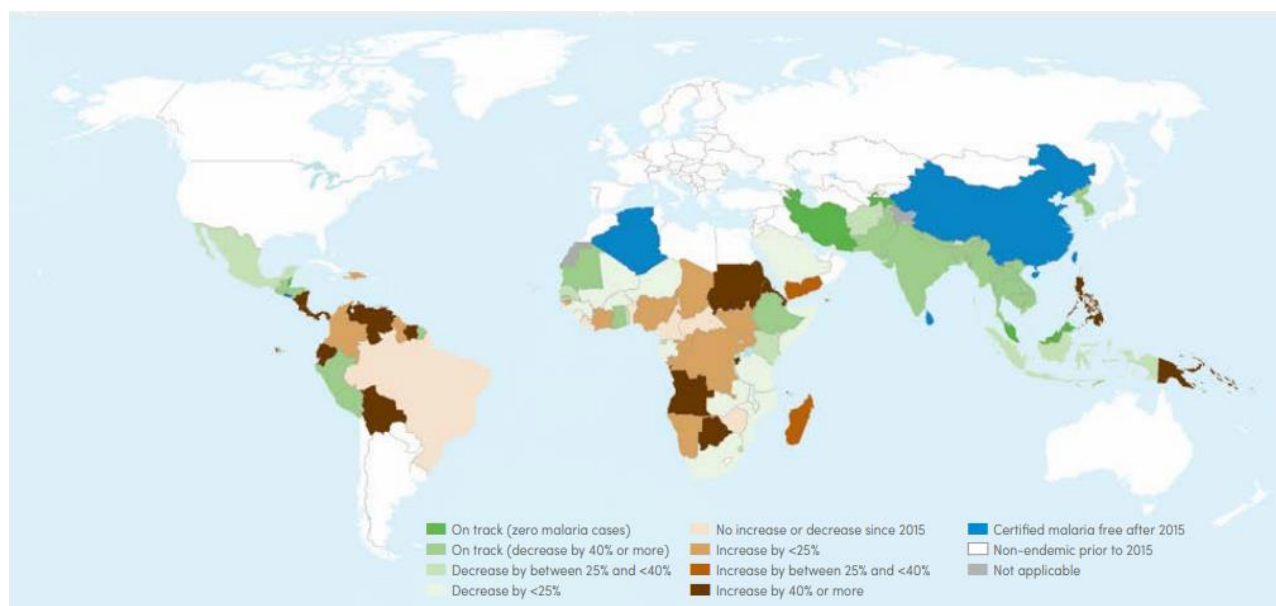


Figura 1: Mapa dos países endêmicos da malária. Fonte: OMS (2021).

Na região das Américas, embora avanços significativos tenham sido feitos para eliminação da malária em vários países endêmicos da região, a OMS estima que 139 milhões de pessoas vivam em áreas com condições ecológicas e socioeconômicas favoráveis a diversos graus de transmissão da malária no continente (OMS, 2019). Atualmente, a malária ocorre em 18 países da região (Figura 2), sendo a maioria das infecções (quase 75%) causada por *P. vivax*, seguido de *P. falciparum* e misto (25%) e outros (<1%). Em 2020, a região apresentou uma redução de 467.000 em 2019 para 232.000 em número de casos, em partes devido às restrições de movimento durante a pandemia de COVID-19, assim como diminuição de acesso aos cuidados, reduzindo os casos notificados. Em 2020, foram registrados na região 409 mortes, sendo a maioria em adultos (77%). Três países responderam por quase 77% de todos os casos notificados: Venezuela (55%), Brasil (22%) e Colômbia (11%) (OMS, 2021).

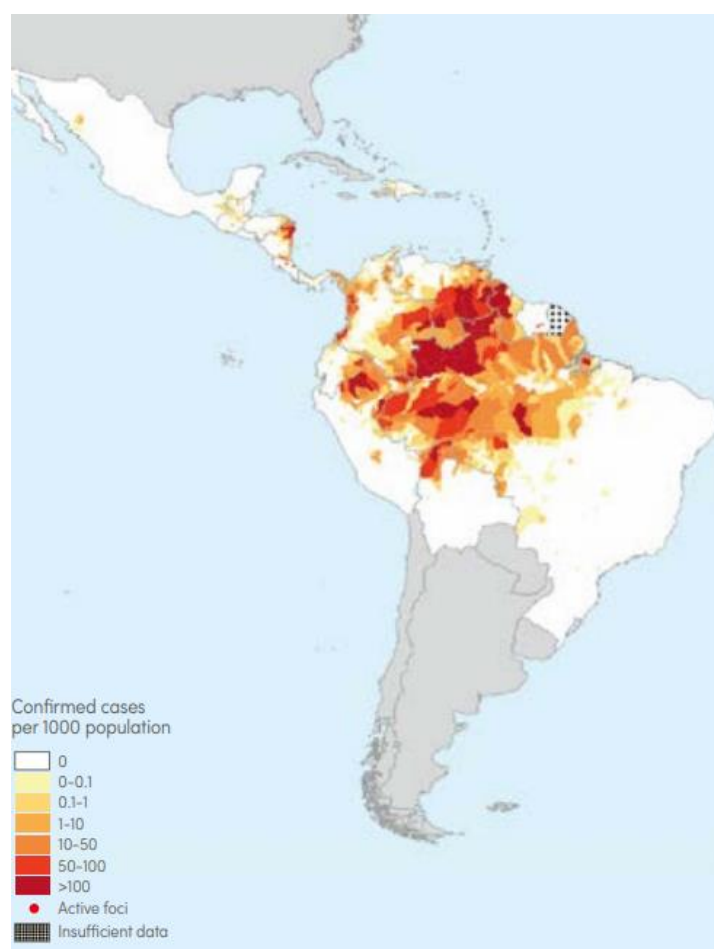


Figura 2: Distribuição de casos de malária confirmados por 1000 habitantes no ano de 2020 na América do Sul. Fonte: OMS (2021).

No Brasil, a transmissão da malária predomina na região amazônica abrangendo cerca de 99% dos casos no país. A região compreende os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão. Nas áreas fora da região amazônica mais de 80% dos casos registrados são importados dos estados pertencentes à área endêmica e outros países amazônicos ou do continente africano. Segundo o Ministério da Saúde em 2021, foram registrados 139.112 casos no país, com total de 118.651 (83%) casos notificados causados por *P. vivax* e 22.182 (17%) por *P. falciparum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Em 2020, segundo Incidência Parasitária Anual (IPA), na região amazônica, 29 municípios foram classificados como de alto risco, 47 de médio risco, 54 de baixo risco e 128 municípios de muito baixo risco (Figura 3) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

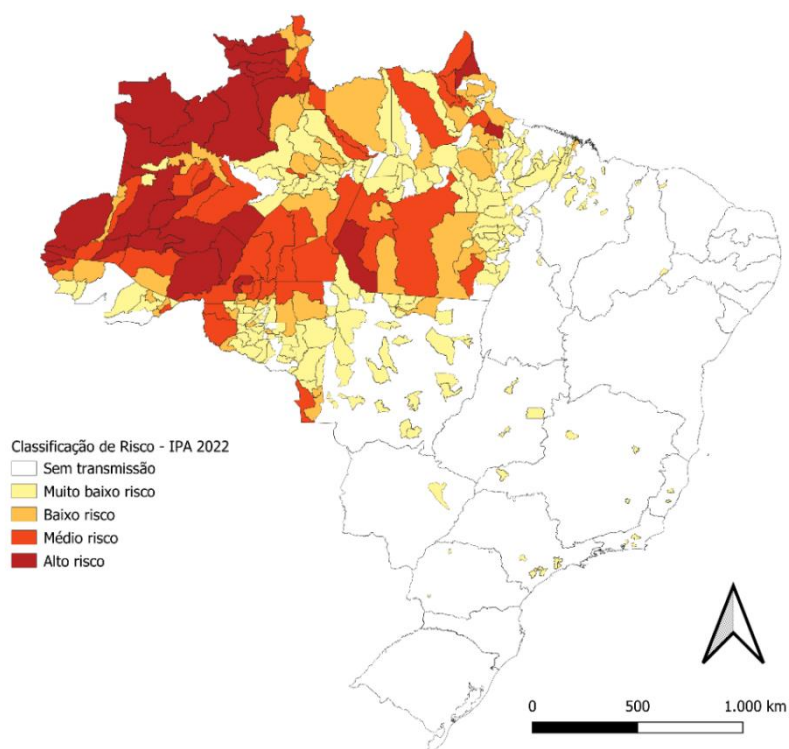


Figura 3: Mapa de risco de malária por município de infecção. Fonte: Ministério da Saúde (2022).

Contribuindo com 41,1% do total de casos de malária da região Amazônica no ano de 2020, o estado do Amazonas registrou um total de 58.973 casos de malária. Dos 62 municípios do estado, considerando o recorte de janeiro de 2020 a junho de 2021, 58 municípios (93,5%) apresentaram transmissão de malária. Destes, 15 concentraram 80% do total de casos de malária no estado. A IPA do estado no ano de 2020, foi de 14,0 por cada

mil habitantes, sendo o estado com o segundo maior IPA do Brasil, ficando atrás apenas do estado de Roraima. Deve-se levar em consideração a alta prevalência de casos assintomáticos e sub-notificados que pode duplicar o número de casos no Amazonas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

2.2 Ciclo de vida e aspectos clínicos

Todas as espécies de *Plasmodium* compartilham um ciclo de vida semelhante: o parasita infecta uma pessoa (ou hospedeiro vertebrado) e é transmitido do paciente com malária (ou hospedeiro vertebrado infectado) para outro hospedeiro por um inseto vetor (PERKINS, 2014). Os vetores que transmitem as cinco espécies de *Plasmodium* que infectam naturalmente os humanos são os mosquitos fêmea do gênero *Anopheles*, pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus*, sendo mais importante no Brasil a espécie *Anopheles darlingi*, cujo criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, muito frequentes na Amazônia brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

O ciclo de vida do *Plasmodium* começa quando parasitas conhecidos como esporozoítos (estágio plasmodial infeccioso) são inoculados na derme pela picada do mosquito vetor, os esporozoítos migram rapidamente para o fígado e invadem os hepatócitos, fase conhecida como esquizogonia hepática. Dentro dessas células, cada esporozoíto inicia uma fase de reprodução assexuada resultando na formação de um esquizonte, que contém milhares de merozoítos. A ruptura de esquizontes maduros gera a liberação de merozoítos na corrente sanguínea. Nessa fase hepática, o desenvolvimento do parasita nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para *P. falciparum* e cerca de duas semanas para *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitas desenvolvem-se rapidamente, enquanto outros ficam em estado de latência no fígado (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012; KARIUKI; WILLIAMS, 2020).

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos atingem e invadem as hemácias rapidamente para iniciar um processo de multiplicação assexuada, o que dá início a fase chamada de esquizogonia sanguínea. Dentro das hemácias, os merozoítos amadurecem em trofozoítos e depois em esquizontes, que finalmente se rompem das hemácias infectadas liberando a nova geração de merozoítos que infectam rapidamente novas hemácias, e assim

continuando o ciclo eritrocitário. Os ciclos eritrocitários repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*. No momento da ruptura do esquizonte, a liberação de parasitas da malária e material eritrocitário na circulação induz o processo fisiopatológico da malária e o aparecimento dos sintomas (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012; KARIUKI; WILLIAMS, 2020).

Depois de algumas gerações de merozoítos nas hemácias, uma pequena proporção de parasitas se desenvolve em estágios sexuais masculinos e femininos, chamados de gametócitos. Esses gametas no interior das hemácias não se dividem e, quando ingeridos pelos mosquitos vetores, os gametócitos são ativados e se diferenciam em feminino (macrogameta) e masculino (microgameta), que dá início ao ciclo esporogônico. O microgameta fertiliza o macrogameta para produzir o zigoto, o único estágio de desenvolvimento do parasita que possui um genoma diplóide. Logo, o zigoto sofre meiose e se diferencia em oocineto, possuindo quatro genomas haploides em seu núcleo. O oocineto penetra na parede do intestino do mosquito e forma um oocisto no lado externo. Quando o oocisto amadurece, ele se rompe e numerosos esporozoítos produzidos são liberados na hemolinfa e migram para glândulas salivares, onde adquirem a capacidade de infectar células humanas no momento da picada pelo inseto durante uma refeição de sangue (Figura 4) (BILLKER et al., 1998; MEIBALAN; MARTI, 2017; SATO, 2021).

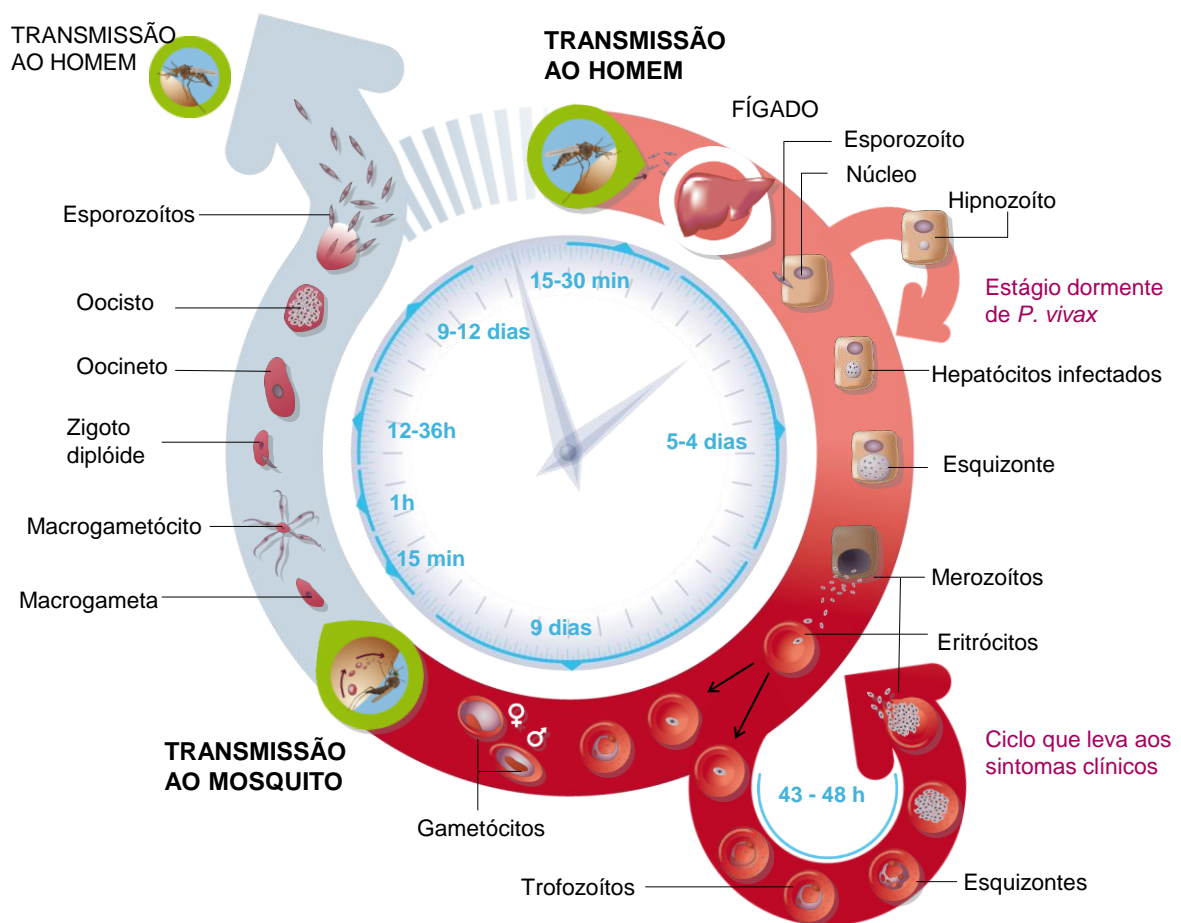


Figura 4: Ciclo de vida do *Plasmodium*. Fonte: Adaptado de *Medicines for Malaria Venture*. Disponível em: <https://www.mmv.org/malaria-medicines/parasite-lifecycle>. Acesso em 01 de fevereiro de 2022.

As manifestações clínicas da malária são dependentes do estado imunológico prévio do hospedeiro. Os primeiros sintomas da malária, comuns a todas as diferentes espécies de malária, são inespecíficos e simulam uma síndrome semelhante à gripe. A marca registrada da malária é a febre. Até dois dias antes do início da febre, sintomas prodrômicos, como mal-estar, anorexia, lassidão, tontura, vontade de alongar os membros e bocejar, dor de cabeça, dor nas costas, mialgias, náuseas, vômitos e sensação de frio pode ser experimentado. A febre geralmente é irregular no início e a temperatura aumenta com calafrios. Depois de alguns dias a febre tende a se tornar periódica dependendo da esquizogonia sincronizada (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012).

Embora a malária por *P. falciparum* seja a principal causa de malária grave e morte, nos últimos anos tem se observado um padrão incomum de complicações clínicas associadas a infecção por *Plasmodium vivax*, com um crescente aumento do número de pacientes que

necessitam de internação hospitalar (PRICE et al., 2007). Além da hemorragia fatal rara devido à ruptura traumática ou espontânea de um baço aumentado, outras complicações da infecção por *P. vivax* foram relatadas, incluindo complicações de convulsão, choque, icterícia, insuficiência renal, anemia grave, coma e síndrome do desconforto respiratório agudo (ALEXANDRE et al., 2010; KOCHAR et al., 2005; LUXEMBURGER et al., 1996). Tais complicações clínicas são semelhantes às que são causadas por *Plasmodium falciparum*, sugerindo desta maneira que o *P. vivax* seja capaz de provocar malária grave.

2.2.1 Particularidades do ciclo de vida de *P. vivax*

P. vivax tem um ciclo de transmissão complexo com características biológicas distintas em comparação com outras espécies de *Plasmodium*. A principal característica distintiva da biologia do *P. vivax* é sua capacidade de formar estágios hepáticos de longa duração, os hipnozoítos (ADAPA et al., 2019). Ao entrar no fígado, os esporozoítos de *P. vivax* podem seguir duas vias distintas. Alguns desenvolvem-se diretamente em esquizontes hepáticos, que após 8 dias liberam merozoítos para iniciar o ciclo assexuado, enquanto outros, os hipnozoítos, “param” seu desenvolvimento a partir do terceiro dia após a infecção, permanecendo dormentes por semanas ou meses antes de serem reativados (BETUELA et al., 2012; MIKOLAJCZAK et al., 2015; WHITE, 2011). Como não existem testes diagnósticos que possam detectar infecções em estágio hepático latentes, portadores de hipnozoítos indetectáveis são uma importante fonte potencial de reintrodução de *P. vivax* e, se não tratada adequadamente, pode causar novas infecções do estágio sanguíneo meses após a infecção primária (ADAMS; MUELLER, 2017).

Ao contrário do *P. falciparum*, que pode invadir e se desenvolver em hemácias de todas as idades, o *P. vivax* evoluiu para invadir preferencialmente os reticulócitos. Essas células ocorrem mais frequentemente na medula óssea do que na circulação, resultando em parasitemia de baixa densidade ou submicroscópicas no sangue periférico, muitas vezes indetectáveis (GALINSKI; BARNWELL, 2008). Além disso, em contraste com os gametócitos de *P. falciparum* que sofrem desenvolvimento prolongado ao longo de 10 a 12 dias, os gametócitos de *P. vivax* se desenvolvem rapidamente, possivelmente com a primeira geração de merozoítos liberados no fígado, e aparecem no sangue quase simultaneamente com os parasitas do estágio assexuado do sangue. Portanto, a transmissão para mosquitos pode ocorrer antes do início dos sintomas clínicos (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011;

VALLEJO et al., 2016). Essas características únicas do ciclo de vida do *P. vivax* promove uma transmissão altamente eficaz e persistente, e que representam grandes desafios para o controle e eliminação da malária *vivax* no mundo.

2.3 Tratamento da malária *vivax*

O tratamento da malária se baseia principalmente na quimioterapia. Os antimaláricos visam atingir o parasita em pontos-chaves de seu ciclo evolutivo, que podem ser pela interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção; pela destruição de formas latentes do parasita no ciclo tecidual (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas; e interrupção da transmissão do parasita, pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitas (gametócitos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). O tratamento da malária com o uso de determinados antimaláricos depende de alguns fatores, como a espécie de *Plasmodium*, o grau da infecção, a idade do paciente, história de exposição anterior à infecção e gestação.

O objetivo do tratamento da malária causada pelo *P. vivax* é curar tanto a forma sanguínea quanto a forma hepática, e assim prevenir a recrudescência e recaída, respectivamente (OMS, 2020). Segundo os protocolos estabelecidos pela OMS, usa-se a combinação de dois medicamentos para o tratamento, sendo a primaquina utilizada para forma hipnozoíta e a cloroquina para o estágio sanguíneo. Na América do Sul, a primaquina é utilizada em regime de 7 dias em uma dose baixa de 3,5 mg base/kg (CHU; WHITE, 2021). No entanto, a primaquina causa hemólise em pacientes com deficiência glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDd), e este risco de hemólise limitou substancialmente seu uso. O problema da deficiência de G6PD é algo que leva grande preocupação por profissionais de saúde, principalmente em regiões onde a prevalência das formas graves desta alteração é elevada (HOWES et al., 2013; LOVER et al., 2018).

Desde 1946, a cloroquina tem sido o medicamento de primeira linha para o tratamento contra a fase sanguínea assexuada de *P. vivax* na maior parte do mundo (BERLINER et al., 1947). O regime de tratamento padrão é de 25 mg de equivalente base/kg dividido em 3 dias e administrado como 10 mg/kg inicialmente seguido por 10 mg/kg em 24 horas e 5 mg/kg em 48 horas. Assim, o tratamento, tradicionalmente dividido em 3 dias,

pode ser considerado uma dose de ataque. Quando usada cronicamente em altas doses para o tratamento de doenças autoimunes, a cloroquina se acumula no corpo com níveis detectáveis no plasma e nos glóbulos vermelhos por meses ou na urina por até 5 anos após a interrupção do tratamento (BAIRD, 2004; TAYLOR; WHITE, 2004). Os parasitas assexuados em estágio sanguíneo que demonstraram sobreviver a um regime de terapia padrão normalmente absorvido pode ser classificado como resistentes a essa terapia (GONÇALVES; CRAVO; FERREIRA, 2014).

2.4 Diagnóstico da malária

O diagnóstico da malária envolve a identificação de parasitas ou antígenos/produtos da malária no sangue do paciente. Embora possa parecer simples, a eficácia diagnóstica está sujeita a muitos fatores: as diferentes formas das cinco espécies de malária; os diferentes estágios da esquizogonia sanguínea; a endemicidade de diferentes espécies; inter-relação entre os níveis de transmissão; movimentação populacional; parasitemia; imunidade e sinais e sintomas; a resistência aos medicamentos; os problemas da malária recorrente; e o uso de quimioprevenção podem influenciar a identificação e interpretação da parasitemia da malária em um teste de diagnóstico (TANGPUKDEE et al., 2009).

No laboratório, a malária é diagnosticada usando diferentes técnicas que variam de acordo com o cenário geográfico e clínico. Independentemente do método utilizado, os testes devem estar disponíveis e realizados 24 horas/dia, 7 dias/semana devido à natureza potencialmente fatal da infecção (CORDRAY; RICHARDS-KORTUM, 2012). Os métodos mais comumente usados para o diagnóstico laboratorial da malária são o exame microscópico por coloração de esfregaços finos e espessos de sangue, testes de diagnóstico rápido e métodos de diagnóstico molecular, como a reação de cadeia de polimerase.

2.4.1 Microscopia de luz

O exame microscópico de esfregaços sanguíneos espessos (para triagem do parasita da malária apresentado) e esfregaços sanguíneos finos (para confirmação da espécie) continua sendo o “padrão ouro” para detectar parasitemia no sangue e orientar o tratamento adequado (MBANEFO; KUMAR, 2020). Esfregaços espessos são mais sensíveis em casos de parasitemia de baixo nível e envolvem a colocação de uma a duas gotas de sangue em

uma lâmina em círculo, os glóbulos vermelhos são lisados e vários estágios sanguíneos do parasita (trofozoítos, gametócitos e esquizontes) são liberados. Por outro lado, esfregaços finos são usados para detectar com mais precisão a morfologia das espécies de parasitas, e são preparados espalhando uma gota de sangue em uma lâmina para criar uma borda lisa que contém uma única camada de células (CORDRAY; RICHARDS-KORTUM, 2012).

A sensibilidade e especificidade para este método é de 95% e 98%, quando comparado a PCR, respectivamente. Quando examinado por microscopistas experientes em condições ideais, o limite de detecção para este método é de aproximadamente 10-50 parasitas/ μ L de sangue. A técnica demanda cerca de 60 minutos entre coleta do sangue e o fornecimento do resultado (PHAM et al., 2018; RODULFO et al., 2007).

2.4.2 Testes de diagnóstico rápido (RDTs)

Ao contrário do diagnóstico microscópico convencional, os RDTs são de fácil execução e interpretação de resultados e dispensam o uso de equipamentos de laboratório. Os RDTs são testes imunocromatográficos que se baseiam na detecção de antígenos específicos do parasita em amostras de sangue usando anticorpos monoclonais imobilizados em membranas de tiras de teste utilizando a tecnologia de fluxo lateral. Os resultados são baseados na presença ou ausência de uma linha colorida nas tiras de teste (CORDRAY; RICHARDS-KORTUM, 2012).

Três tipos de antígenos têm sido comumente empregados neste método: a proteína-II rica em histidina de *Plasmodium* (HRP-2), lactato desidrogenase de *Plasmodium* (pLDH) e aldolase específicas de *Plasmodium*. O pHRP-2 é específico para *P. falciparum*, enquanto pLDH e aldolase específica de *Plasmodium* são encontrados em todas as espécies (AMIR et al., 2018). Embora a maioria dos produtos RDTs sejam adequados para o diagnóstico de *P. falciparum*, alguns também afirmam que podem diagnosticar de forma eficaz e rápida a malária por *P. vivax*. Para outras espécies, o RDT só é capaz de indicar a presença do parasita sozinho sem especiação. A sensibilidade do teste varia de 85% a 94,8% e a especificidade varia de 95,2% a 99%. O limite de detecção é comparável ao da microscopia, 50-100 parasitas/ μ L de sangue, e o profissional capacitado é capaz de produzir resultados em 15 a 20 minutos a partir do momento da coleta de sangue (CORDRAY; RICHARDS-KORTUM, 2012; WILSON, 2012).

2.4.3 Métodos de diagnóstico molecular

Técnicas moleculares, como PCR, aumentaram drasticamente a sensibilidade analítica dos ensaios para muitos patógenos humanos, incluindo parasitas da malária. Os métodos moleculares tradicionais para malária incluem PCR com detecção baseada em gel de eletroforese e detecção em tempo real baseada em sonda de DNA ou SYBR Green. Esses ensaios proporcionam a capacidade de fornecer identificação de espécies usando primers e sondas específicas e quantificar com precisão os parasitas utilizando uma curva padrão (CORDRAY; RICHARDS-KORTUM, 2012).

O gene de RNA ribossômico 18S é o alvo mais comumente usado para amplificação e detecção específica, devido ao fato do mesmo conter regiões conservadas do DNA genômico em todas as espécies de *Plasmodium* e regiões específicas para cada espécie, sem a necessidade de sequenciamento posterior. Em particular, o uso dos métodos baseados em PCR são cruciais para identificar pacientes assintomáticos e submicroscópicos, acompanhar a resposta terapêutica, identificar a resistência aos medicamentos e pode ser automatizada para processar muitas amostras. A PCR mostrou maior sensibilidade e especificidade do que o exame microscópico convencional de esfregaços de sangue e RDTs, e apresenta como melhor método para o diagnóstico da malária. O limite de detecção da PCR pode ser tão baixo quanto 0,02 parasitas/ μ l, e geralmente é concluído em duas horas (HÄNSCHEID; GROBUSCH, 2002; ORIERO et al., 2015; PERANDIN et al., 2004).

2.5 Limitações e desafios dos métodos de diagnósticos

Um grande desafio para alcançar a eliminação da malária em ambientes endêmicos é a limitação de recursos (GUERRA; SNOW; HAY, 2006; SNOW et al., 2005). Para ser útil nessas circunstâncias, um método de diagnóstico deve ser de baixo custo, ser executado em equipamentos portáteis, fácil manutenção, ser utilizável sem treinamento extensivo, não necessitar de armazenamento refrigerado de reagentes e entregar resultados precisos e inequívocos rapidamente. A OMS estabeleceu um conjunto de princípios para orientar o desenvolvimento de diagnóstico para essas configurações de ponto de atendimento (POC) de poucos recursos, conhecidas como REASSURED. Além disso, o diagnóstico ideal de malária deve ser capaz de determinar qual a espécie está infectando o paciente, determinar

o nível de parasitemia e ser capaz de detectar infecções de baixo nível (LAND et al., 2018; MURPHY et al., 2013; OMS, 2020).

Embora os métodos convencionais de diagnóstico da malária atendam a um ou mais dos critérios REASSURED, nenhum atende a todos eles. A microscopia de luz, embora seja sensível, não atende a todos os critérios devido à sua dependência de eletricidade e pessoal altamente treinado. Em contraste, os RDTs não possuem dependência de eletricidade, têm baixo custo, baixa necessidade de treinamento de pessoal e geram resultados rápidos, no entanto, sua implementação é dificultada porque o limite de detecção não é baixo o suficiente para identificar pessoas com baixa parasitemia. A PCR também requer fornecimento de eletricidade, pessoal altamente treinado e é mais caro que a microscopia e RDTs. Além disso, os ensaios baseados em PCR são menos viáveis de serem realizados no POC, devido à alta complexidade, dependência de um aparelho caro, extração de DNA de amostra de paciente e os reagentes devem ser armazenados frios para manter sua função (MBANEFO; KUMAR, 2020).

Em particular, o diagnóstico de malária assintomática causada por *P. vivax* é desafiador porque a parasitemia nesses indivíduos é muitas vezes submicroscópicas, portanto, a microscopia não pode detectar parasitas em uma amostra de sangue. Os RDTs são também incapazes de detectar essas infecções porque seu limite de detecção é maior do que a densidade parasitária de portadores assintomáticos. Embora a PCR seja conhecida como o padrão ouro em teste de diagnóstico molecular, ela não pode sair do ambiente de laboratório devido a depender de um termociclador (MBANEFO; KUMAR, 2020). Entre os métodos isotérmicos, a reação de Amplificação da Polimerase Recombinase (RPA) fornece alta eficiência em um curto espaço de tempo e pode ser utilizado em plataformas de diagnóstico POC, uma vez que este método não requer dispositivos e equipamentos complicados (mais informações acerca dessa técnica está contido em MOTA et al., 2022).

Além disso, parasitas resistentes à cloroquina podem estar aumentando na Amazônia brasileira, e que provavelmente este fato pode contribuir para o surgimento de casos clínicos graves de malária por *P. vivax* (MELO et al., 2014). Nesse sentido, se faz necessário o desenvolvimento de novos métodos e estratégias de intervenção para detectar o parasita e bloquear a transmissão. O desenvolvimento de métodos com alta sensibilidade capazes de identificar a presença do *P. vivax* submicroscópicas e de resistência a cloroquina pode colaborar na erradicação da malária.

2.6 Sistema CRISPR-Cas

CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) juntamente com as proteínas Cas funcionam como um tipo de sistema imunológico adaptativo em procariontes contra ácidos nucleicos invasores, incluindo fagos e plasmídeos conjugativos, incorporando fragmentos dos mesmos dentro do genoma do hospedeiro (MAKAROVA; WOLF; KOONIN, 2013; MOTA et al., 2020). Adjacente à matriz CRISPR, estão presentes um ou mais operons com um cluster de genes Cas que codificam as proteínas efetoras (Cas) deste sistema. Quando há um ataque dos invasores, o ácido nucleico estranho na matriz é transcrito como um RNA curto (RNA guia), que então medeia a clivagem endonucleolítica guiada por RNA do ácido nucleico alvo invasor pelas proteínas Cas (BROUNS et al., 2008; MAKAROVA et al., 2015).

Os sistemas CRISPR-Cas são classificados em duas classes gerais baseadas em análises filogenéticas, genômicas comparativas e na constituição proteica. Os sistemas de classe I consistem em várias proteínas Cas auxiliando no reconhecimento e clivagem dos ácidos nucleicos invasores, enquanto os sistemas de classe II envolvem uma única proteína efetora com múltiplos domínios para reconhecer a sequência invasora (MOTA et al., 2020). Os sistemas CRISPR ainda foram classificados em seis tipos: tipos I, III e IV (classe I) e tipos II, V e VI (classe II), e até o momento estão subdivididos em 30 subtipos aproximadamente. A natureza dos sistemas de classe II são amplamente empregados em um conjunto de ferramentas biotecnológicas por requerer menos componentes a serem utilizados em comparação com os sistemas de classe I (MAKAROVA et al., 2015).

A resposta imune mediada por CRISPR-Cas funciona através de três etapas principais: A primeira etapa é a adaptação (ou aquisição de espaçador), na qual a célula hospedeira incorpora no próprio genoma novos ácidos nucleicos exógenos, conhecidos como espaçadores, na matriz CRISPR. A etapa de adaptação é seguida pelo processamento de RNA guia (crRNA), o qual após uma segunda infecção, o sistema transcreve os pequenos pedaços de RNA (crRNA) contendo as informações do gene da espécie invasora e traduz a proteína Cas com atividade endonuclease. A etapa final é a interferência, em que os crRNAs orientam as proteínas Cas para reconhecer sequências semelhantes no ácido nucleico invasor que é então clivado e inativado pelo complexo CRISPR-Cas (Figura 5) (JACKSON et al., 2017; PLAGENS et al., 2015).

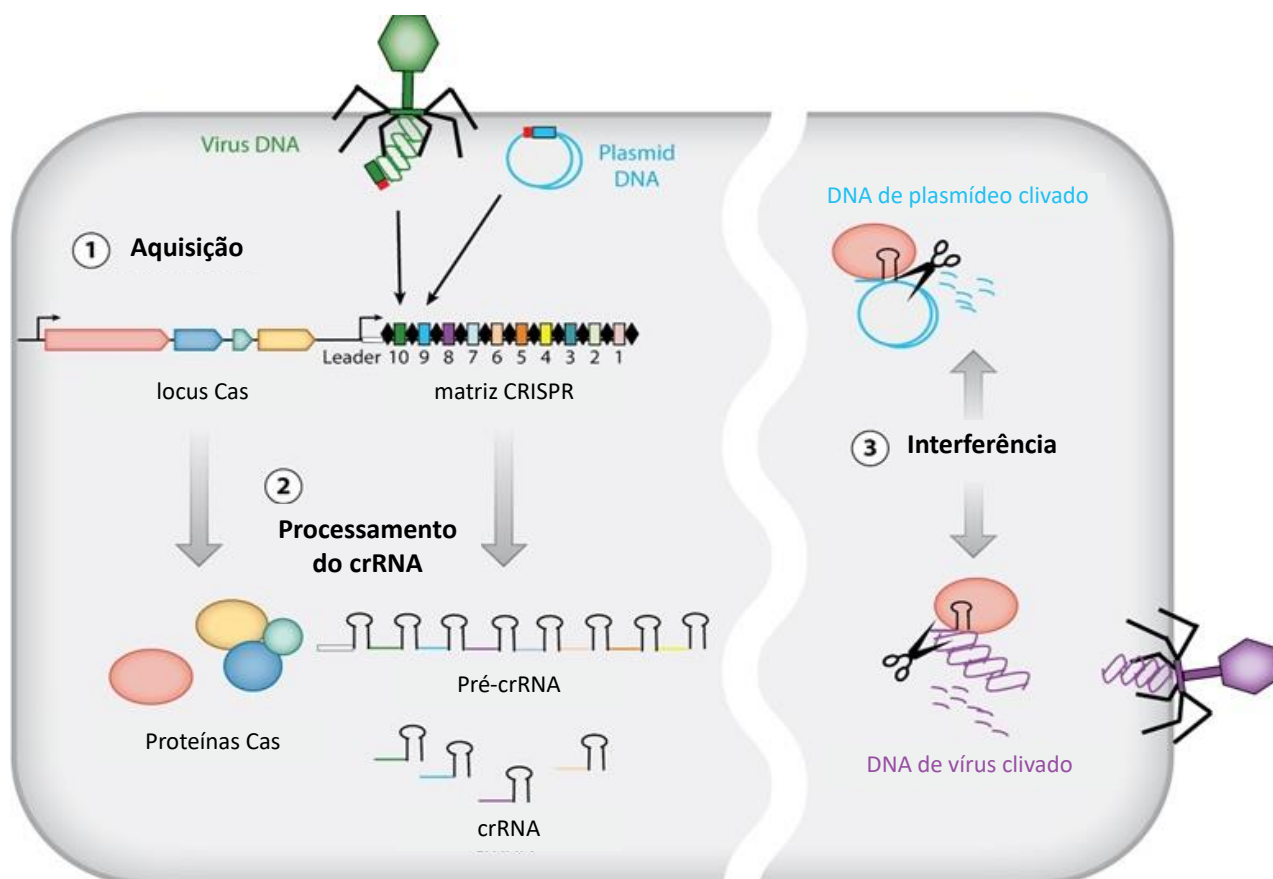


Figura 5: Mecanismo de imunidade adaptativa mediada por CRISPR-Cas em procariontes. 1. Aquisição de novos espaçadores na matriz CRISPR. 2. Processamento da expressão do RNA guia (crRNA). 3. Detecção de interferência dos elementos genéticos exógenos por CRISPR-Cas. Fonte: Adaptado de Bharathkumar et al. (2021).

O advento do sistema CRISPR abriu novas oportunidades para dispositivos POC com custo-benefício, fornecendo alta especificidade e sensibilidade (BAYAT et al., 2018). Os sistemas CRISPR-Cas oferecem ferramentas excelentes para edição de genoma e engenharia genética, e recentemente, para detecção de ácido nucleico com extrema sensibilidade e capacidade de programação (FREIJE et al., 2019; KUMAR et al., 2020). Além disso, os sistemas baseados em CRISPR/Cas permitem alternativas multiplex altamente específicas, rápidas e econômicas para detectar ácidos nucleicos alvo, como vírus, bactérias, mutações cancerígenas e proteínas, e que poderiam alcançar os requisitos da OMS para o diagnóstico (JIA et al., 2020).

2.6.1 Diagnóstico baseado em CRISPR-Cas13a

Uma série de tecnologias baseadas em CRISPR usadas para detectar ácidos nucleicos de patógenos foram relatadas. Enquanto algumas utilizam tanto a identificação quanto a clivagem do alvo, outras funcionam unicamente com base no RNA guia e na identificação da proteína Cas do alvo. Quando a atividade colateral do sistema CRISPR-Cas13 foi descoberta, os diagnósticos baseados no sistema CRISPR-Cas foram rapidamente desenvolvidos (EAST-SELETSKY et al., 2016). Tal atividade colateral fornece a base para abordagens sensíveis e altamente específicas para a detecção de ácido nucleico. A caracterização experimental desta proteína efetora revelou um recurso altamente versátil para novas tecnologias de direcionamento de RNA que foram recentemente desenvolvidas para detectar ácidos nucleicos aproveitando a atividade colateral (ABUDAYYEH et al., 2016).

Os sistemas CRISPR-Cas13 compreendem apenas dois componentes: a proteína Cas13a, que possui uma atividade de ribonuclease fornecida por seus dois domínios de ligação a nucleotídeos procarióticos e eucarióticos superiores (HEPN); e um crRNA que reconhece uma sequência no RNA alvo, com preferência por alvos com um motivo de sítio flanqueador de protoespaçador (PFS). Uma vez ativados pela ligação específica do RNA alvo, esses sistemas conferem atividade colateral e degradam não especificamente os RNAs (LIU et al., 2017). A Cas13a da bactéria gram-negativa *Leptotrichia shahii* (LshCas13a) foi a primeiro ortólogo Cas13 a ser aproveitado para atividades programáveis de direcionamento de RNA (ABUDAYYEH et al., 2016). Desde a primeira descrição de LshCas13a, vários estudos identificaram mais variantes de proteínas Cas13 pertencentes a diferentes famílias. A proteína de *Leptotrichia wadei* (LwaCas13a) foi relatada para mediar a atividade de segmentação de RNA e obteve resultado mais robusto do que o sistema LshCas13a (ABUDAYYEH et al., 2017).

A atividade ribonuclease guiada por RNA da proteína LwaCas13a e sua clivagem não específica de RNAs de fita simples permitiu a Gootenberg e colaboradores (2017) desenvolver e otimizar um método denominado SHERLOCK (Specific High-sensibilidade Enzymatic Reporter unLOCKing). O processo de SHERLOCK envolve duas etapas. Na primeira etapa, o DNA da amostra é submetido à amplificação da polimerase recombinase (RPA) e o DNA amplificado sofre transcrição da polimerase T7 para RNA. Na segunda etapa, o RNA amplificado resultante é submetido a reação CRISPR-Cas13a. A ligação do

crRNA ao RNA alvo ativa a atividade colateral de Cas13 e cliva os repórteres de RNA fluorescentes que são adicionados à reação. Consequentemente, a intensidade de fluorescência pode ser monitorada usando o leitor de espectroscopia (Figura 6).

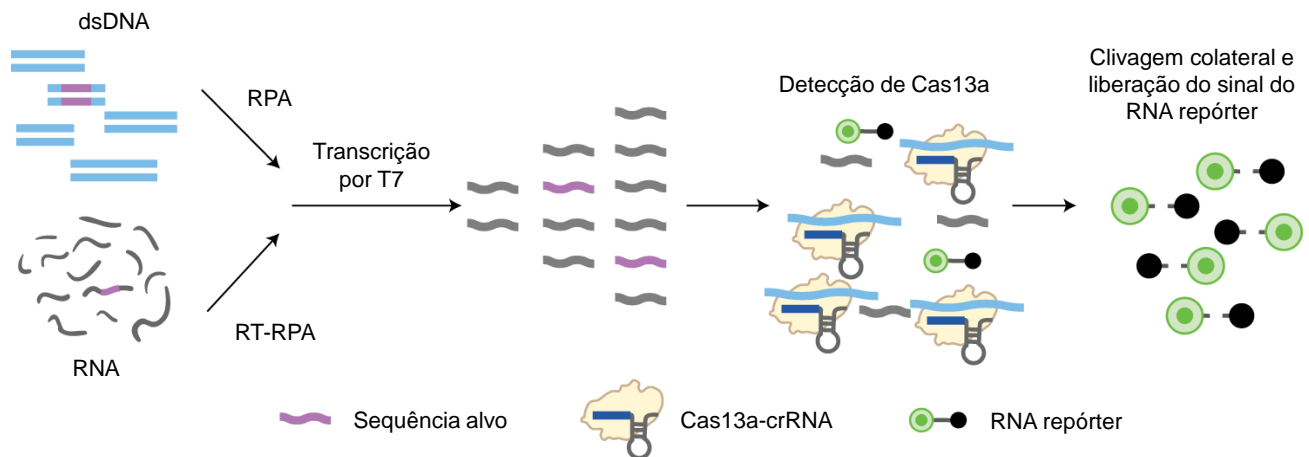


Figura 6: Ensaio de detecção do método SHERLOCK. Etapas do ensaio, iniciando com a pré-amplificação de DNA ou RNA, os alvos amplificados são convertidos em RNA através da transcrição pela T7 e são detectados pelo complexo Cas13A-crRNA, que ativam e clivam os RNAs fluorescentes. Fonte: Adaptado de Kellner et al. (2019).

Este método permite a detecção rápida e sensibilidade de ácidos nucleicos em concentrações até aproximadamente 10^{-18} mol/L e distinguiu com sucesso alvos como cepas africanas e americanas de vírus da Zika, diferentes sorotipos de Dengue, cinco alelos de genes relacionados à saúde da saliva humana e várias mutações relacionadas ao câncer em suspensões de DNA livre de células (GOOTENBERG et al., 2017; KELLNER et al., 2019). Em geral, entre as principais vantagens dos métodos de detecção baseados em CRISPR-Cas13 relatadas estão: 1) tempo de resposta rápido; 2) requisitos de infraestrutura limitados; 3) amplificação isotérmica que evita a necessidade de termociclagem; 4) especificidade da sequência alvo em o nível de nucleotídeo único; e 5) a possibilidade de adaptação para permitir a detecção POC.

2.7 Biossensores

2.7.1 Conceitos Gerais

O conceito de biossensores foi definido pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) como um dispositivo integrado independente, que pode combinar diretamente um tipo de transdutor com um tipo de elemento biométrico, de modo que possa especificamente analisar o alvo quantitativamente ou semiquantitativamente (THÉVENOT et al., 2001). Na Figura 7 é possível observar esquematicamente as partes que compreendem um biossensor típico. Primeiramente, uma substância de interesse, denominado de analito, se liga especificamente ao biorreceptor. O processo durante a interação do biorreceptor com analito, denominado de bioreconhecimento, resulta em um sinal que é captado pelo transdutor. O sinal do transdutor é convertido em sinais mensuráveis (como sinais elétricos, sinais ópticos, sinais acústicos, etc.) e amplificado por um circuito detector usando a referência apropriada e enviado para o processamento, por exemplo, *software* de computador para que a resposta correspondente possa ser lida e compreendida pelo usuário (CASTILLO-HENRIQUEZ et al., 2020).

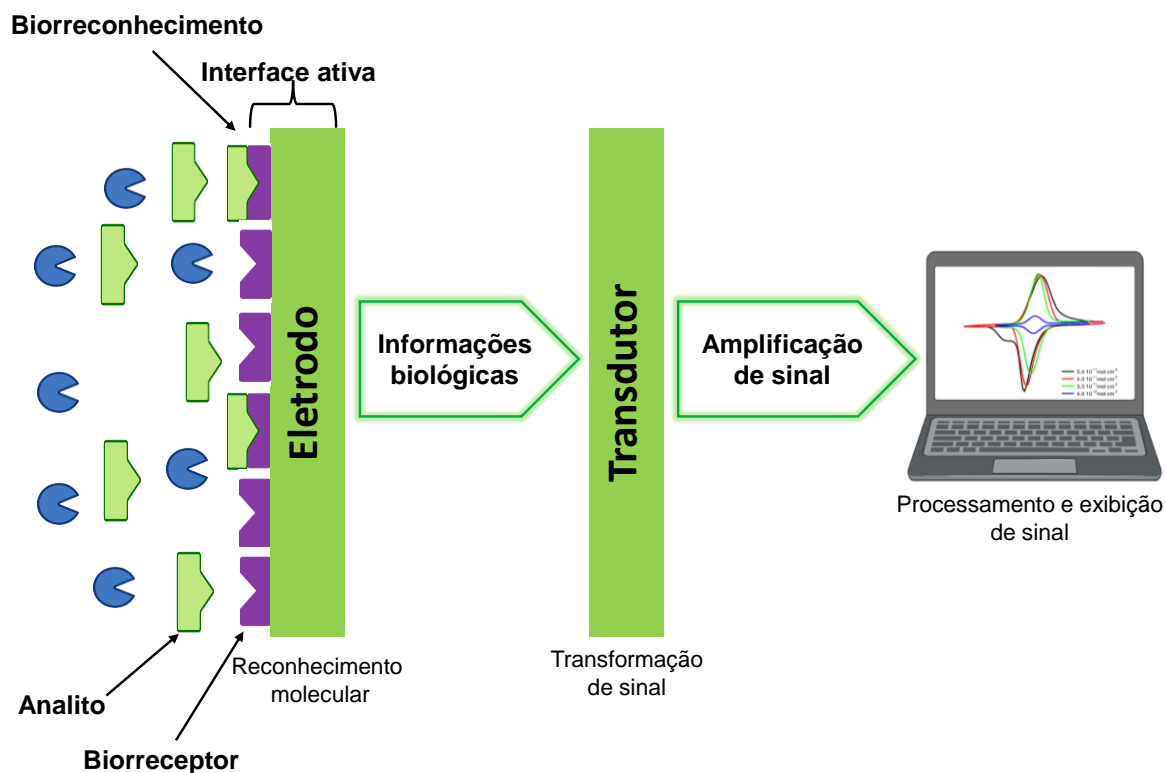


Figura 7: Elementos e componentes de um biossensor típico. Fonte: Adaptado de Ronkainen et al. (2010).

O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark e Lyons em 1962, conhecido como biossensor de glicose (CLARK; LYONS, 1962). Esse biossensor era composto por um eletrodo de oxigênio, uma membrana interna semipermeável ao oxigênio e uma fina camada de glicose oxidase (GOx) imobilizada em uma membrana de diálise. A diminuição do nível de oxigênio foi proporcional à concentração de glicose resultante da oxidação catalisada pela enzima de β -D-glicose em β -D-glucono- δ -lactona. Desde este trabalho pioneiro, grandes esforços foram feitos tanto na tecnologia envolvendo a sua constituição quanto na variabilidade de suas aplicações. Na saúde, mais especificamente no diagnóstico, os biossensores tem sido utilizado na identificação de bactérias, fungos, parasitas e vírus (FANG; NG; LI, 2003; FERNANDO; MAGNER, 2020; SOLAIMUTHU et al., 2020).

Os biossensores podem ser aplicados a uma grande variedade de amostras, incluindo fluidos corporais, amostras de alimentos, culturas de células e ser usados para analisar amostras ambientais. Projetados para esse fim, os biossensores são altamente seletivos devido à possibilidade de adaptar a interação específica de compostos pela imobilização de elementos de reconhecimento biológico no substrato do sensor que possuem uma afinidade de ligação específica à molécula desejada. Enzimas, células, aptâmeros, ácidos nucleicos e anticorpos são exemplos de elementos de reconhecimento típicos usados em biossensores (CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). De acordo com o princípio do bioreconhecimento, os biossensores são classificados como biossensores catalíticos e biossensores de afinidade. Os biossensores catalíticos incorporam enzimas ou células inteiras que reconhecem o analito alvo e produzem espécies eletroativas. Os biossensores de afinidade dependem de uma interação de ligação seletiva entre o analito e um componente biológico, tal como um anticorpo (HUANG et al., 2021; NARESH; LEE, 2021).

Os biossensores podem ainda ser classificados de acordo com o tipo de transdutores utilizados, podendo ser classificados em biossensores eletroquímicos, eletrônicos, térmicos, ópticos, gravimétricos e acústicos (SHARMA; MUTHARASAN, 2013). Os biossensores eletroquímicos tem sido extensivamente utilizado e ocupam uma posição importante nos biossensores atuais, têm sido amplamente aplicados na análise clínica, industrial, ambiental e agrícola. Esses biossensores podem ser facilmente adaptados para a detecção de uma ampla gama de analitos e podem ser incorporados em dispositivos minituarizados robustos, portáteis, de baixo custo, com alta sensibilidade, e seletividade (D'ORAZIO, 2003; WILSON, 2005).

2.7.2 Biossensores eletroquímicos

O princípio básico para esta classe de biossensores é que as reações químicas entre a biomolécula imobilizada e o analito alvo produzem ou consomem íons ou elétrons que causam alguma mudança nas propriedades elétricas mensuráveis da solução. De modo geral, o sensor eletroquímico opera interagindo com o analito e consequentemente disponibilizando um sinal elétrico proporcional à concentração do analito. Como as reações geralmente são detectadas apenas nas proximidades da superfície do eletrodo, os próprios eletrodos desempenham um papel crucial no desempenho dos biossensores eletroquímicos. Com base na função escolhida de um eletrodo específico, o material do eletrodo, sua modificação de superfície ou suas dimensões influenciam muito sua capacidade de detecção (REZAEI; IRANNEJAD, 2019; SINGH et al., 2021).

Uma célula eletroquímica típica contém três eletrodos básicos necessários na análise eletroquímica, que incluem o eletrodo de trabalho (WE), local para reação de redução-oxidação do analito; o eletrodo de referência (RE), um eletrodo com valor potencial de meia célula conhecido e constante; e o contra eletrodo (CE), como auxílio para manter o equilíbrio das correntes de difusão no eletrodo de trabalho (BARD; FAULKNER, 2001; WANG, 2006). O uso de eletrodos tradicionais requer volumes de amostra relativamente altos e configuração de células bastante complicada, pois não são adequados para aplicações em campo. Nesse sentido, os eletrodos impressos (SPEs) surgiram como alternativas de destaque superando as limitações dos eletrodos convencionais (Figura 8) (HALEEM et al., 2021).

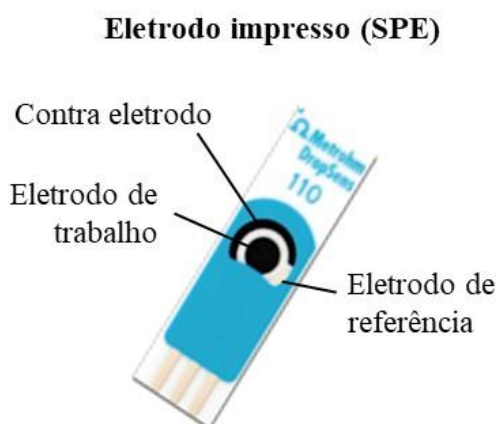


Figura 8: Eletrodo impresso de carbono (SPCE) comercializado pela empresa Metrohm Dropsens.

O SPE é uma tecnologia bem desenvolvida utilizada desde a década de 1990 para produção em massa de sensores eletroquímicos descartáveis e econômicos. Os SPEs são fabricados em substratos cerâmicos ou plásticos, nos quais são impressos diferentes tipos de tintas (carbono, grafite, prata e ouro). Essas tintas podem ser modificadas com nanomateriais ou enzimas entre outros compostos, melhorando as características analíticas dos biossensores desenvolvidos a partir desses eletrodos. Além de sua principal função que é a fabricação personalizável, os SPEs possui facilidade de modificação da superfície do eletrodo, são altamente sensíveis, econômicos e apresentam tamanho pequeno (PÉREZ-FERNÁNDEZ; COSTA-GARCÍA; DE LA ESCOSURA- MUÑIZ, 2020).

Algumas técnicas eletroquímicas são utilizadas para monitorar as mudanças nas características interfaciais, incluindo a voltametria, amperometria, potenciometria, condumetria, impedância e impedância derivada capacitiva (CESEWSKI; JOHNSON, 2020; LOPES; SANTOS; BUENO, 2022). Atualmente, as técnicas voltamétricas têm sido constantemente utilizadas, e essa intensa utilização se deve as suas vantagens, como: baixos limites de detecção, alta sensibilidade, possibilidade de especiação química, análise multielementar, além dos custos relativamente baixos (GUPTA et al., 2017).

2.7.3 Técnicas voltamétricas

O campo da voltametria desenvolveu-se a partir da polarografia, um tipo de voltametria que foi descoberto pelo químico Jaroslav Heyrovsky em 1922. Na polarografia, um eletrodo gotejante de mercúrio é empregado como eletrodo de trabalho para monitorar e identificar reações de diferentes compostos. De modo geral, a voltametria baseia-se na medida da corrente elétrica em uma célula eletroquímica em função da aplicação de potencial, e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante o processo de oxirredução é relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e conseqüentemente, na célula eletroquímica. Os processos de oxidação ou redução que ocorrem na interface eletrodo-solução acontecem a partir da transferência de massa e da transferência de carga, seguido da volta do produto da reação formado na superfície eletródica para a solução (SKOOG, HOLLER e WEST, 2005).

A escolha da técnica voltamétrica a ser utilizada está relacionada com o tipo e a qualidade de informação que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve

a interação entre o analito e o eletrodo de trabalho (GUPTA et al., 2011; LOPES; SANTOS; BUENO, 2022). Dentre as técnicas voltamétricas aplicadas em estudos eletroanalíticos, destaca-se, neste trabalho, a voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD).

2.7.3.1 Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica importante e amplamente empregada para estudar picos de oxidação ou redução, que são proporcionais à concentração de uma espécie química que oxida ou reduz o eletrodo (SKOOG, HOLLER e WEST, 2005). Para um dado experimento de VC, as medidas são realizadas variando o potencial na forma de uma onda triangular (Figura 9A) com velocidade conhecida, onde o potencial aplicado varia linearmente com o tempo e ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao potencial inicial. De acordo com o sinal de excitação da VC, picos catódicos e/ou anódicos podem ser obtidos, isso vai depender do tipo de mecanismo redox que a molécula sofre no eletrodo. Por exemplo, se a reação for reversível ou quase-reversível, um par de picos catódico e anódico será obtido, porém se a reação for irreversível apenas um dos picos (catódico ou anódico) será observado (Figura 9B) (BRETT e BRETT, 1996; BARD; FAULKNER, 2001).

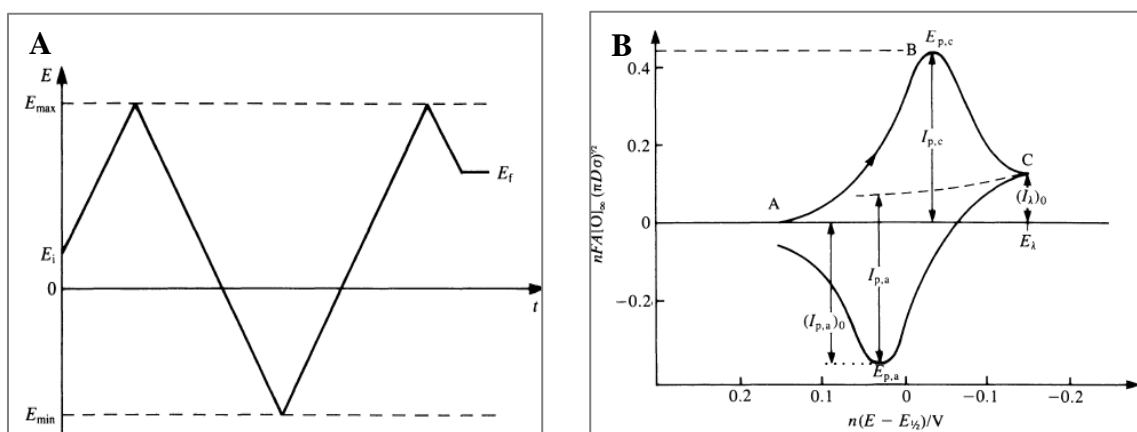


Figura 9: A: Sinal de excitação proveniente da técnica VC; B: Voltamograma cíclico para um sistema reversível. Fonte: BRETT e BRETT, 1993.

No caso de um processo reversível, a velocidade de transferência de elétrons em ambas as direções é extremamente rápida e o sistema atinge o equilíbrio durante todos os

processos redox, gerando um pico simétrico ao pico de redução. Os processos quase-reversível ocorre quando a velocidade relativa de transferência de elétron com respeito àquela do transporte de massa é insuficiente para manter o equilíbrio das espécies na superfície do eletrodo. Na região quase-reversibilidade, a corrente observada terá contribuição de ambas as reações, e como consequência os processos serão reversíveis para baixas velocidades de varredura e irreversíveis para altas velocidades de varredura. Os processos irreversíveis demonstram que a velocidade de transferência de carga é lenta quando comparada com a velocidade de varredura, deste modo, e as concentrações das espécies oxidadas e reduzidas não serão mais função apenas do potencial (BRETT e BRETT, 1993; BARD; FAULKNER, 2001).

2.7.3.2 Voltametria de pulso diferencial (VPD)

A VPD foi proposta por Barker e Gardner no ano de 1953, com a finalidade de diminuir os limites de detecção e quantificação de compostos eletroquimicamente ativos. Na DPV, a corrente é medida duas vezes, um pouco antes da aplicação do pulso e novamente no final do pulso (Figura 11A). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e essa diferença de corrente [$\Delta I = I(2) - I(1)$] é colocada em gráfico contra o potencial aplicado. O voltamograma de pulso diferencial resultante (Figura 11B) consiste em picos de corrente, cuja altura é diretamente proporcional à concentração do analito de interesse (BRETT e BRETT, 1996; SKOOG, HOLLER e WEST, 2005).

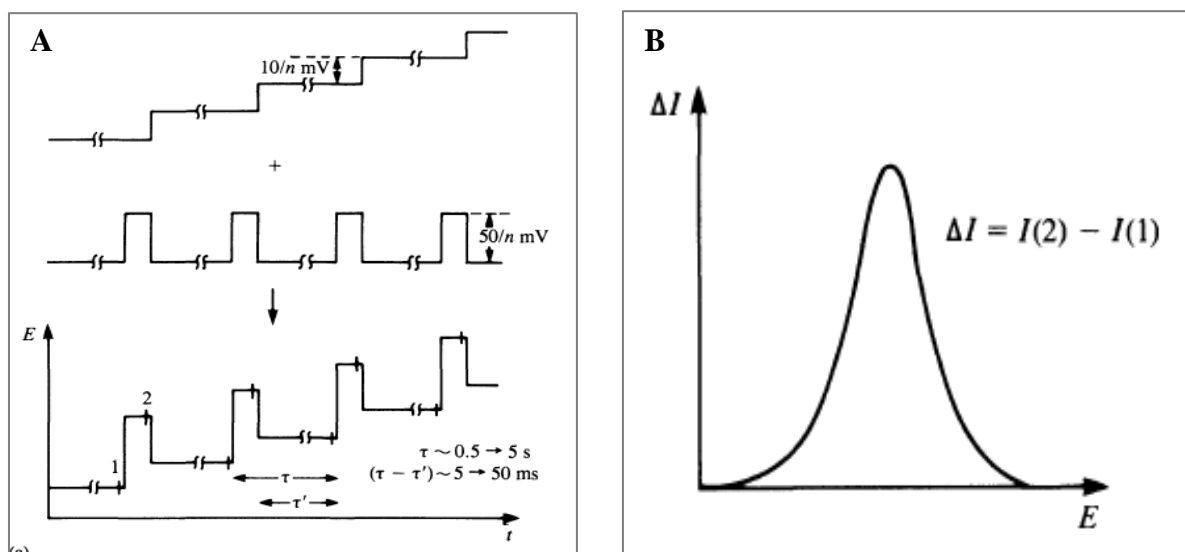


Figura 10: A Esquema de aplicação de potenciais; B Voltametria de pulso diferencial. Fonte: BRETT e BRETT, 1993.

Geralmente, o limite de detecção obtido com a VPD é duas ou três ordens de magnitude menor quando comparado com os valores obtidos por voltametria clássica. A maior sensibilidade da voltametria de pulso diferencial pode ser atribuída a duas fontes: o primeiro está relacionado ao aumento da corrente faradaica, e o segundo, uma diminuição da corrente de carga, ou não-faradaica (SKOOG, HOLLER e WEST, 2005).

A seleção da amplitude de pulso e velocidade da varredura normalmente requer um equilíbrio entre sensibilidade, resolução e velocidade. Por exemplo, amplitude de pulso maior resulta em picos maiores e mais amplos. Sistemas redox irreversível resulta em picos mais baixos e mais amplos (isso é, sensibilidade e resolução inferiores) em comparação com os valores previstos para os sistemas reversíveis. Além das melhorias na sensibilidade e resolução, a técnica pode fornecer informações sobre a química em que o analito é exibida (estado de oxidação, complexação etc.) (SKOOG, HOLLER e WEST, 2005).

2.8 Biossensores eletroquímicos baseados em CRISPR-Cas

Juntamente com as vantagens das técnicas eletroquímicas e do sistema CRISPR-Cas é possível alcançar melhorias significativas no biossensor com amostras biológicas, que geralmente são prejudicadas pela presença de interferentes, resultando em impedimento do processo de transferência de elétrons e medições subsequentes (PRIYA SWETHA et al., 2021). Nos últimos anos, a utilização de sistema CRISPR-Cas em biossensores eletroquímicos têm recebido grande atenção devido à sua alta sensibilidade, curto tempo de detecção e portabilidade do instrumento. Este tipo de sensor converte principalmente a informação genômica de patógenos em sinais elétricos, estabelecendo a relação entre os sinais elétricos e a concentração do alvo.

Biossensores eletroquímicos ultrasensíveis foram construídos usando a atividade de clivagem colateral das proteínas efetoras Cas. Por exemplo, Dai e colaboradores estabeleceram um biossensor de clivagem colateral baseado em Cas12a, denominado E-CRISPR, que permitiu a detecção de papilomavírus humano em concentrações ultrabaixas (50 pmol L^{-1}). Neste sistema, um DNA de fita simples (ssDNA) especificamente modificado foi usado como repórter eletroquímico. A extremidade 3' do repórter foi marcada com azul de metileno (AM) como agente redutor, e a extremidade 5' foi imobilizada com uma ligação tiol para o repórter fixado em eletrodo de ouro. Quando o alvo estava presente no sistema, a

atividade de clivagem não específica de Cas12a foi ativada e a clivagem do repórter AM-ssDNA fez com que AM se separasse da superfície do eletrodo de ouro, resultando em uma diminuição na conversão do sinal AM, enquanto na ausência do alvo, a atividade de clivagem colateral de Cas12a é inibida (DAI et al., 2019).

Posteriormente, Zhang e colaboradores usaram um repórter de DNA em forma de grampo para substituir o repórter ssDNA linear no sistema original baseado no princípio de detecção de E-CRISPR. Este repórter eletroquímico de DNA em forma de grampo pode não apenas aproximar o AM do eletrodo e reduzir a eficiência de conversão de elétrons, mas também devido à sua baixa cobertura de superfície e estrutura morfológica compacta pode melhorar a sensibilidade de detecção. Após otimizar as condições do sistema, o teste pode detectar 30 pmol L⁻¹ de DNA alvo em 60 minutos com a combinação de LAMP e E-CRISPR (ZHANG et al., 2020). Estes biossensores de base eletroquímica, o alvo pode ser detectado quantitativamente analisando a mudança do sinal elétrico no sistema após a adição do alvo, o que reduz os reagentes complexos necessários para a reação e os custos.

Recentemente Ma e colaboradores (2024) desenvolveram um biossensor eletroquímico combinando as vantagens de CRISPR/Cas13a e da reação de troca de primer (PER) para a detecção sensível de miRNAs sem a necessidade de amplificação de alvo. Denominado de PER-E-CRISPR, o biossensor utiliza um par de grampos estáveis que permanecem não ligados entre si na ausência do alvo miR-21. Com o reconhecimento do alvo por CRISPR-Cas13a, a Cas13a é ativada e leva a clivagem colateral do sítio HP1 dentro do grampo 1, levando ao desdobramento da estrutura de haste-alça de HP1. Após a introdução de grampo 2, o segmento de fita simples exposto de HP1 no grampo 1 pode hibridizar com o grampo 2, iniciando o sítio de ligação para concatêmeros PER. Múltiplos DNAs curtos de fita simples marcados com azul de metileno ligam-se ao PER para aprimoramento do sinal eletroquímico. Sob condições otimizadas, o ensaio PER-E-CRISPR obteve um limite de detecção de 30,1 fM (MA et al., 2024).

Diante do exposto, o desenvolvimento de testes baseados em CRISPR-Cas13a pode permitir a detecção rápida e específica para malária em concentrações ultrabaixas. Para reduzir problemas fora do alvo, o sistema CRISPR-Cas13a pode ser combinado ao biossensor eletroquímico pois detecta seletivamente incompatibilidades de nucleotídeo único. Isto, em teoria, aumentaria a sensibilidade deste método tornando possível sua utilização em POC através da utilização de um oligonucleotídeo imobilizada na superfície

de eletrodo. O sistema CRISPR-Cas13a combinado com biossensor eletroquímico baseado em oligonucleotídeo pode detectar o material genético de *P. vivax* presente na reação de forma específica, rápida e sensível.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver ensaios moleculares baseados no sistema CRISPR/Cas13a para detecção de *Plasmodium vivax*.

3.2 Objetivos Específicos

1. Realizar levantamento bibliográfico acerca da técnica de Amplificação da Polimerase Recombinase (RPA) e sua implementação em diversas áreas da pesquisa;
2. Detectar *Plasmodium vivax* em amostras clínicas através do ensaio baseado no sistema CRISPR/Cas13a por fluorescência;
3. Desenvolver um biossensor eletroquímico baseado no sistema CRISPR/Cas13a mediante imobilização de oligonucleotídeo sobre a superfície de eletrodos impressos de carbono modificados com estreptavidina (SPCE/STV) para detecção molecular de *Plasmodium vivax*.

CAPÍTULO 1

4. CAPÍTULO 1: ARTIGO DE REVISÃO

Neste primeiro capítulo é apresentado um artigo de revisão já publicado referente ao primeiro objetivo específico deste trabalho, no qual foi realizado um levantamento bibliográfico acerca da técnica de Amplificação da Polimerase Recombinase (RPA), uma nova tecnologia isotérmica para diagnóstico molecular. Desse modo, buscou-se com esta revisão apresentar os aspectos gerais do RPA, focando-se no uso da tecnologia combinada a métodos de detecção para o diagnóstico clínico em diferentes doenças infecciosas. Destacando a técnica na utilização em diferentes aplicações, por exemplo, em estratégias para uso na agricultura, veterinária e no monitoramento da segurança alimentar. Diante disso, o RPA pode tornar-se uma alternativa promissora combinado ao sistema CRISPR/Cas para o diagnóstico molecular de malária, assim como já descrito para outras doenças infecciosas.

Informações sobre o artigo:

Título: Recombinase polymerase amplification in the molecular diagnosis of microbiological targets and its applications.

Revista: Canadian Journal of Microbiology

Publicado: 08/04/2022

Número de citações: 12

Referência Bibliográfica: Mota DS, Guimarães JM, Gandarilla AMD, Filho JCBS, Brito WR, Mariúba LAM. Recombinase polymerase amplification in the molecular diagnosis of microbiological targets and its applications. Can J Microbiol. 2022 Jun;68(6):383-402. doi: 10.1139/cjm-2021-0329. PMID: 3539-4399.

AMPLIFICAÇÃO DA POLIMERASE RECOMBINASE NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ALVOS MICROBIOLÓGICOS E SUAS APLICAÇÕES

D. S. Mota¹, J. M. Guimarães², A. M. D. Gandarilla³, J. C. B. S. Filho⁴, W. R. Brito^{3,4}, L. A. M. Mariúba^{1,5,6,7}

- 1- Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-005, Brasil
- 2- Centro Multiusuário para Análises de Fenômenos Biomédicos, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, 69065-00, Brasil
- 3- Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-005, Brasil
- 4- Laboratório de Bioeletroquímica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-005, Brasil
- 5- Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ), Manaus, AM, 69057-070, Brasil
- 6- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;
- 7- Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 21040-360, Brasil

Autor correspondente: Luis André Morais Mariúba
Email: andre.mariuba@fiocruz.br

Resumo: Desde a introdução da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em 1983, a amplificação de ácidos nucleicos tem permeado todos os campos da ciência biológica, particularmente a pesquisa clínica. Apesar de sua importância, a PCR tem sido restrita a centros especializados e seu uso em laboratórios com poucos recursos é limitado. Em nas últimas décadas, houve um aumento notável no desenvolvimento de novas tecnologias isotérmicas para diagnóstico molecular, na esperança de superar as limitações tradicionais do laboratório. Dentre essas tecnologias, a amplificação da polimerase recombinase (RPA) tem um enorme potencial de aplicação pois não requer termocicladores e possui alta sensibilidade, especificidade, simplicidade e velocidade de detecção. Esta técnica tem sido usada para amplificação de DNA e RNA em diferentes organismos patogênicos, como vírus,

bactérias e parasitas. Além disso, o RPA tem sido implementado com sucesso em diferentes estratégias de detecção, tornando-o uma alternativa promissora para realização de diagnósticos em ambientes com recursos escassos e com alta carga de doenças infecciosas. Neste estudo, apresentamos uma revisão do uso da RPA em ambientes clínicos e sua implementação em diversas áreas de pesquisa.

Palavras-chave: Amplificação isotérmica, Amplificação da Polimerase Recombinase, diagnóstico de doenças, detecção métodos.

1. Introdução

A aplicação de tecnologias de amplificação de ácido nucléico teve um impacto importante em todos os campos da ciência, desde a biologia molecular, biotecnologia à aplicação médica. Essas tecnologias para amplificação de DNA e RNA foram desenvolvidas devido, principalmente, ao estímulo da alta demanda pela detecção de sequências específicas de ácidos nucléicos para o diagnóstico clínico em diferentes patógenos (Bartlett; Stirling, 2003). A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma tecnologia considerada o padrão ouro para a detecção de patógenos devido sua rapidez, precisão e reprodutibilidade significativamente altas (Higuchi et al., 1992; Piorkowski et al., 2014; Yang; Rothman, 2004).

Desenvolvida por Kary Mullis em 1983, a PCR é baseada em um sistema de ciclagem térmica com desempenho exponencial de amplificação de uma única molécula de ácido nucleico para bilhões de cópias *in vitro*, ao fornecer temperaturas sucessivas favoráveis aos processos de replicação do ácido nucleico (desnaturação da fita, anelamento do primer e extensão enzimática) (Mullis et al., 1986). Contudo, requisitos como equipamentos sofisticados para fornecer o controle preciso de aquecimento e resfriamento cíclico indispensáveis para este método, tem limitado a PCR dentro de laboratórios, impedindo sua aplicação em ambientes não especializados e com poucos recursos. Não é surpresa, portanto, que esses locais permanecem vulneráveis a uma alta carga de doenças infecciosas, incluindo AIDS, malária e tuberculose (Dye, 2014; Wekesa, 2019).

Essas limitações estimularam o desenvolvimento de uma técnica da biologia molecular conhecida como Amplificação Isotérmica de Ácido Nucleico para atender especificamente aos desafios de realizar diagnósticos fora de instalações bem equipada. Os métodos de amplificação isotérmica requerem apenas uma única temperatura, favorecendo

a implementação dessa tecnologia em condições de incubação simplificada para replicação artificial do ácido nucleico, sem a necessidade de uma termociclagem (Labarre et al., 2011; Walker et al., 1992a, 1992b). A incubação em uma única temperatura reduz as exigências de equipamentos onerosos, além disso, a eliminação de etapas repetidas de aquecimento e resfriamento fornece tempo reduzido de amplificação quando comparados aos ensaios de PCR convencionais. As reações mais rápidas na amplificação isotérmica se deve não apenas a eliminação da ciclagem térmica, mas também a várias reações moleculares ocorrendo de forma assíncrona (Deng; Gao, 2015; Gill; Ghaemi, 2008).

Atualmente, vários métodos de amplificação isotérmica foram desenvolvidos e adotaram diferentes mecanismos de reação para detecção molecular. Tais métodos de amplificação incluem Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) (Notomi et al., 2000), Amplificação Baseada em Sequência de Ácido Nucleico (NASBA) (Sumio Lijima, 1991), Amplificação Dependente de Helicase (HDA) (Vincent; Xu; Kong, 2004), Amplificação por Deslocamento de Fita (SDA) (Walker et al., 1992b), Amplificação de Iniciação Cruzada (CPA) (Fang et al., 2009) e Amplificação da Polimerase Recombinase (RPA) (Piepenburg et al., 2006). Dentre essas tecnologias, o RPA se destaca pela sua simplicidade, alta sensibilidade, especificidade, velocidade, compatibilidade com multiplexação, além de um funcionamento em temperatura baixa e constante.

Desde o primeiro relatório em 2006, o RPA tem sido empregado em diferentes diagnósticos *in vitro*, detecção biológica e outros campos (Liu et al., 2016; Magro et al., 2017; Xu et al., 2014). De modo geral, o RPA amplifica o DNA para níveis detectáveis em apenas 5-30 minutos, dependendo do tamanho dos amplicons, do número de cópias e do tipo de amostra (Piepenburg et al., 2006). Os reagentes RPA estão disponíveis em formatos liofilizados, o que facilita o transporte até o ponto de atendimento sem a necessidade de armazenamento em cadeia de frio. Além disso, os produtos resultantes da amplificação podem ser visualizados em vários instrumentos de detecção ou integrado em diferentes plataformas, oferecendo assim, flexibilidade para sua ampla adoção em ambientes com poucos recursos (Jiang et al., 2020; Rostron et al., 2019).

Com a ampla adoção desta ferramenta isotérmica molecular em muitos campos de diagnóstico, o RPA tem sido usado para diferentes tipos de organismos-alvo, com diferentes tipos de amostras combinadas a diferentes técnicas (Li et al. 2018; Lobato e O'Sullivan 2018). Esta revisão concentra-se no conhecimento atual da técnica RPA e suas aplicações na detecção de diversos microrganismos. Apresentamos aqui os aspectos gerais do RPA técnica

e seu uso no diagnóstico de doenças infecciosas humanas, incluindo virais, bacterianas e parasitárias doenças. Além disso, aplicações para detecção de outros patógenos estão listados, como a detecção de agentes patogênicos em plantas, animais e a monitorização da segurança alimentar.

2. Aspectos gerais de RPA

A técnica RPA foi inicialmente desenvolvida por Piepenburg et al. para uso em microbiologia médica na detecção de patógenos humanos através da amplificação de DNA, mais tarde, a técnica foi estendida para aplicação em alvos de RNA em diferentes tipos de organismos através da adição da enzima transcriptase reversa na mesma reação (Ghosh; Kokane; Gowda, 2020; Piepenburg et al., 2006; Silva et al., 2018). O mecanismo de amplificação de ácidos nucleicos de RPA se baseia em uma adaptação modificada de um processo natural denominado recombinação homóloga, um processo importante no metabolismo do DNA. O RPA trabalha utilizando três proteínas principais, incluindo proteína recombinase, DNA polimerase e a proteína de ligação ao DNA de fita simples (SSB), que juntamente com os componentes auxiliares realizam o mecanismo de reação (Piepenburg et al., 2006).

A reação começa quando a proteína recombinase se liga aos primers de oligonucleotídeos para formar um complexo recombinase-primer, e esse complexo resultante procura por sequências homólogas de DNA alvo, fazendo uma espécie de varredura a sequência de DNA. Uma vez que o local específico é encontrado, a recombinase catalisa o processo de hibridização de primers com a sequência alvo, formando uma estrutura D-loop. Esse processo é auxiliado pela proteína SSB que se liga à fita complementar desenrolada para estabilizar o D-loop. Posteriormente, a recombinase se desmonta do complexo e se torna disponível para iniciar uma nova reação de deslocamento de fita com um novo primer. Finalmente, a incorporação do primer permite que a enzima DNA polimerase inicie a síntese a partir da ligação a extremidade 3'-OH livre e a extensão de uma nova fita é iniciada. As fitas recém-geradas são usadas para outra rodada de RPA,

consequentemente, a repetição cíclica deste processo resulta na obtenção de amplificação exponencial (Figura 1) (Boyle et al., 2014; Ghosh et al., 2018; Piepenburg et al., 2006).

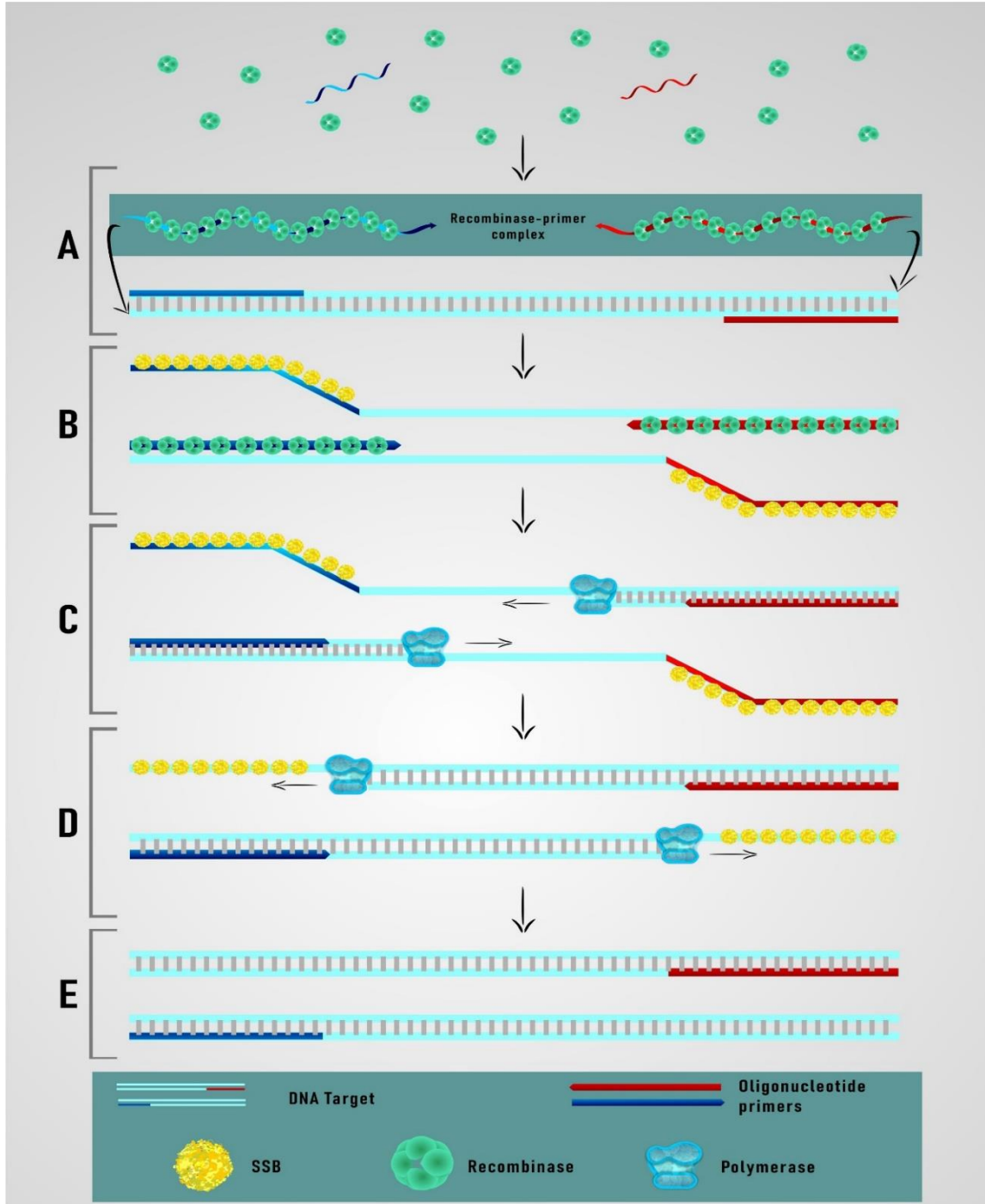


Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de amplificação da polimerase recombinase. (A) A formação de complexos recombinases com cada iniciador oligonucleotídico que varre o DNA em busca de sequências homólogas; (B) com a ajuda de proteínas de ligação ao DNA de fita simples (SSB), os primers são inseridos na sequência complementar do DNA modelo, e as recombinases são então desmontadas do complexo; (C) A DNA polimerase estende o primer; (D) deslocamento das duas fitas originais do DNA modelo; (E) a amplificação exponencial é obtida pela repetição cíclica deste processo.

Os reagentes para RPA são atualmente comercializados apenas para uso em pesquisa através da empresa TwistDx TM, fornecendo kits que consistem em tubos individuais contendo pellets liofilizados, tampão de reidratação e acetato de magnésio, que é usado como iniciador da reação (Twistdx, 2018). De acordo com orientações do fabricante, o tamanho dos amplicons RPA devem ser inferiores a 500 nucleotídeos para uma amplificação mais eficiente, no entanto, o RPA pode amplificar longas sequências de até 1,5 kb. O comprimento dos primers devem ser relativamente longos, em torno de 30-35 bases de comprimento para formação ideal do complexo de recombinase-primer, mas alguns estudos anteriores demonstraram que os primers de PCR (em torno de 18-25 nucleotídeos) podem ser usados para uma reação eficiente alcançada (Mayboroda et al., 2016; Piepenburg et al., 2006). O tempo necessário para amplificar o DNA geralmente são de 5 a 30 minutos, dependendo exclusivamente do número de cópias iniciais do material genético e o tamanho do amplicon (XIA et al., 2014). A reação completa é realizada a uma única temperatura de 25° a 42° C, seguindo a formulação do kit RPA. Para controlar a temperatura de reação, diversos aparelhos podem ser empregados, incluindo incubadoras, blocos de aquecimento, aquecedores químicos, calor corporal ou em temperatura ambiente (acima de 25 °C) (Chandu et al., 2016; Kersting et al., 2014a).

2.1 Métodos de detecção combinados com RPA

Os ensaios RPA podem ser monitorados usando diferentes métodos de detecção de uso comum (Fig. 2), incluindo detecção baseada na quantificação de DNA usando sondas fluorescentes e um fluorímetro, e os resultados são obtidos durante a fase de incubação, que geralmente é dentro de 10 minutos (Boyle et al. 2013; Loo et al. 2013). O ensaio de fluxo lateral é outra técnica amplamente combinada com a RPA, na qual a amplificação ocorre na presença de três oligonucleotídeos (dois primers e uma sonda). Consequentemente, dois marcadores estão incluídos em um amplicon de DNA que pode ser detectado em um tipo de ensaio sanduíche usando anticorpos ou um acoplado a um anticorpo estreptavidina. Esses amplicons podem ser usados diretamente, sem purificação, para gerar resultados em um formato que possa ser lido visualmente. Por outro lado, os produtos resultantes da reação RPA pode ser visualizada por eletroforese em gel de agarose, através da separação de fragmentos de DNA de vários tamanhos. Primeiro, os amplicons devem passar por uma etapa de

purificação devido à presença de ligantes na mistura e evitar bandas manchadas no gel (Ghosh e outros. 2018; Rohrman e Richards-Kortum 2012).

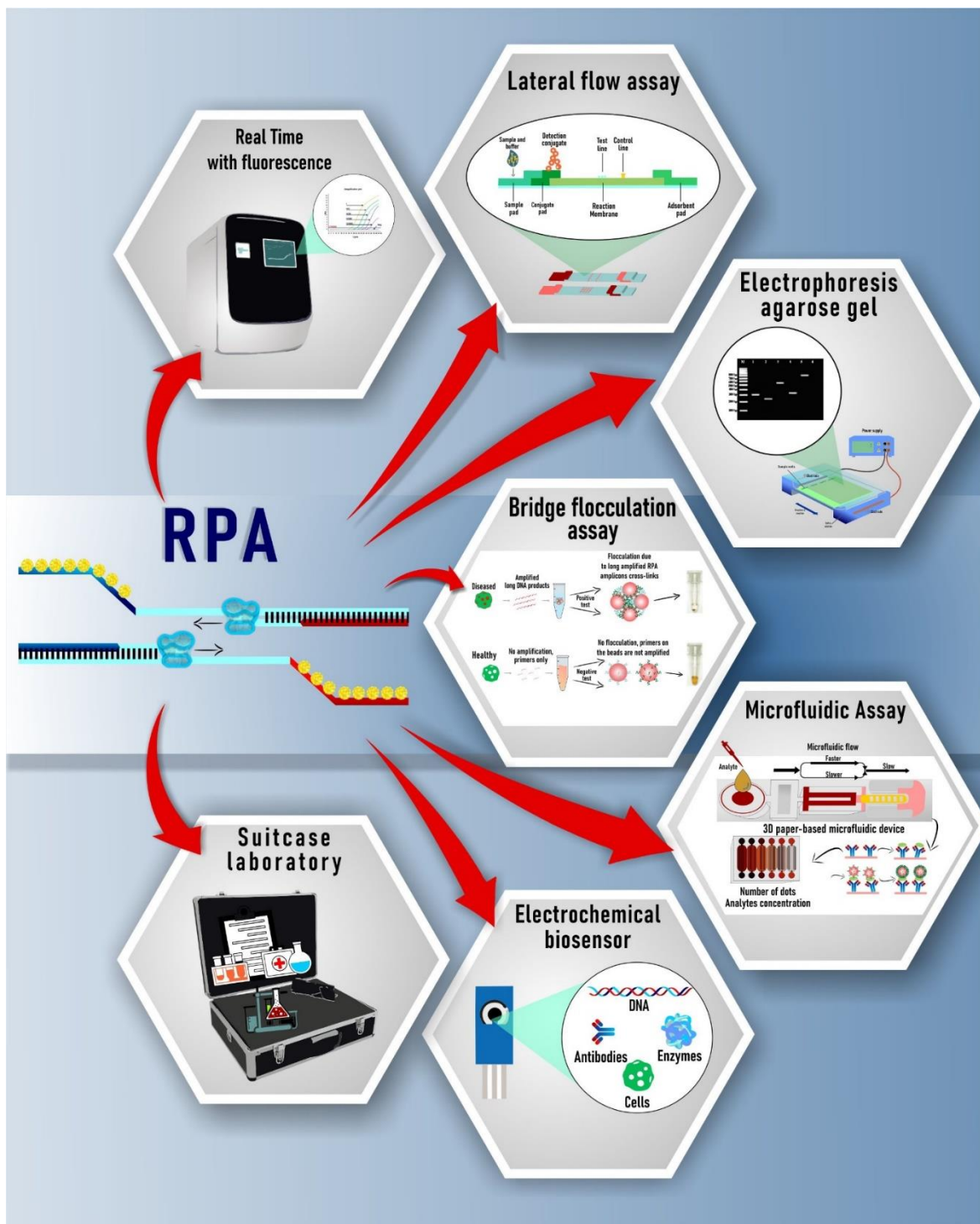


Figura 2: Representação esquemática de diferentes plataformas de detecção que podem ser combinadas com a técnica de Amplificação da Polimerase Recombinase (RPA).

Além disso, plataformas alternativas podem ser programadas para que o RPA gere maior sensibilidade e melhore a eficiência isotérmica. Podem ser testes de floculação, que envolvem o uso de polímeros longos para reticular múltiplas partículas (esferas magnéticas) em um agregado sob condições específicas de tampão. Consequentemente, os amplicons de RPA precipitados nas superfícies dos grânulos magnéticos podem reticular vários outros conjugados de RPA e, assim, flocular da solução, causando uma transição brusca entre a fase de solução e floculada. Este método não usa etiquetas ou modificações no DNA/partícula ou equipamento para confirmar a presença de amplificação de DNA, o que oferece vantagens durante seu uso e é considerado um bioensaio sem rótulo e de baixo custo (Ng et al. 2015; Wee et al. 2015).

RPA integrado em ensaios microfluídicos pode fornecer alternativas simples e de baixo custo para a detecção de patógenos e, no mundo desenvolvido, estão sendo utilizadas para aplicações no ponto de atendimento (POC). O desenvolvimento deste tipo de teste contribui para a automação da preparação de amostras, amplificação de ácidos nucleicos, diluição e sinal detecção (Daher et al. 2016; Lutz et al. 2010). Tsaloglou et al. (2015) relataram uma plataforma microfluídica baseada no conceito SlipChip e implementação isotérmica de RPA em tempo real que tem como alvo o gene da toxina B de *Clostridium difficile* (tcdB) que codifica a toxina B, que é uma das proteínas responsáveis pela toxicidade bacteriana. O dispositivo atingiu um limite de detecção (LoD) de 1000 cópias/reação de DNA, correspondente a 1 fg, em menos de 20 min. Yang et al. (2019) construíram um microfluídico flexível, vestível e semelhante a um curativo Sensor RPA para detecção rápida de fragmentos ácidos nucleicos conservados do vírus Zika. Neste caso, o LoD foi de 10 cópias/ μ L e exibiu uma precisão bem definida quando aplicado a amostras clínicas de soro.

Outra estratégia promissora é a determinação eletroquímica, na qual a reação RPA é geralmente seguida por medições amperométricas (Fang et al. 2018; Li et al. 2018). O componente biológico no sensor reconhece seu analito e o evento catalítico ou de ligação produzido gera um sinal elétrico detectável, que é monitorado por um transdutor (Lim e Ahmed 2016). Moléculas de DNA acopladas a etiquetas redox-ativas geraram interesse no campo do diagnóstico eletroquímico. A sonda de DNA pode ser imobilizada na superfície do eletrodo, e a subsequente ligação ao analito alvo produz mudanças na resposta eletroquímica, de modo que o sistema DNA/eletrodo possa ser analisado antes e depois da modificação. Neste contexto, biossensores eletroquímicos foram implementados, e o resultados mostraram boa sensibilidade e seletividade para a determinação de componentes

biológicos (Lau et al. 2017; Sánchez-Salcedo et al. 2019). Khaliliazar et al. (2020) usaram uma sonda de DNA stem-loop para detectar DNA amplificado por RPA de *Staphylococcus epidermidis*. O sistema pode especificamente amplificar e detectar 10 cópias/ μ L em um tempo total para amplificação e detecção de 70–75 min. Uma vantagem importante do tratamento POC deve-se ao fato de não requerem purificação após a etapa de amplificação.

3. Uso de RPA no diagnóstico clínico

O RPA tem sido aplicado com sucesso para detecção de diferentes tipos de organismos patogênicos ao homem, incluindo vírus, bactérias e protozoários, com diversos tipos de amostras. Comparado com o PCR convencional, os ensaios RPA exibiram diferentes vantagens, como alta sensibilidade, tempo rápido e menos necessidade de equipamento especializado para o diagnóstico em doenças infecciosas. O limite de detecção e o tempo de resposta variaram entre os ensaios devido a sequência alvo, tamanho do amplicons e o tipo de amostra biológica testada. Nas seções a seguir, são discutidas as limitações dos métodos convencionais de diagnóstico e o uso de RPA para algumas doenças infecciosas (Tabela 1).

3.1 RPA para detecção de doenças infecciosas virais

Os vírus são encontrados em quase todos os ecossistemas da Terra e podem se replicar dentro de células vivas em diferentes tipos de organismos (Delwart, 2007). Sua alta variabilidade, especialmente os vírus de RNA, contribuem para sua maior universalidade, toxicidade e adaptação (Taylor; Kobiler; Enquist, 2012). Neste contexto, o diagnóstico precoce exerce um papel importante no tratamento e erradicação das infecções virais. Inúmeros estudos relataram o uso do RPA na detecção de vírus relacionados a doenças humanas, como o vírus da imunodeficiência humana, doenças respiratórias virais, entre outras.

3.1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), causada pelo vírus HIV, possui como método “padrão ouro” a tecnologia PCR para o diagnóstico da doença devido à alta sensibilidade e especificidade (Alidjinou; Bocket; Hober, 2015). No entanto, geralmente essa técnica depende de equipamentos caros e reagentes complexos, o que torna difícil o acesso em locais de baixa renda. Desde 2012, o RPA provou ser útil na detecção do HIV em

TABELA 1: Uso da Amplificação da Polimerase Recombinase (RPA) no diagnóstico clínico.

RPA no diagnóstico clínico	Alvo	Gene alvo	Molécula	LoD	Especificidade	Tempo de ensaio	Método de detecção	Referências
Doenças Virais	Vírus da Imunodeficiência Humana 1 (HIV-1)	gene <i>gag</i>	DNA	10 cópias/reação	Não mencionado	15 min	Fluorescência em tempo real	Rohrman e Richards-Kortum, 2012
	Vírus da Imunodeficiência Humana 1 (HIV-1)	genes <i>gag</i> , <i>LTR</i> e <i>pol</i>	DNA	3 cópias/reação	gene <i>LTR</i> : 93% e gene <i>Pol</i> : 98.6%	20 min	Fluorescência em tempo real e faixa de fluxo lateral	Boyle et al. 2013
	Vírus da Imunodeficiência Humana 1 (HIV-1)	gene <i>pol</i>	DNA	10 cópias/reação	Não mencionado	20 - 30 min	Fluorescência em tempo real	Lillis et al. 2014
	Vírus da Imunodeficiência Humana 1 (HIV-1)	gene <i>pol</i>	DNA	10 ⁻³⁰ cópias/reação	100%	10 min	Fluorescência em tempo real	Lillis et al. 2016
	Vírus da Imunodeficiência Humana 1 (HIV-1)	gene <i>pol</i>	DNA	100 cópias/reação	Não mencionado	20 - 30 min	Faixa de fluxo lateral	Crannell, Rohrman e Richards-Kortum, 2014
	Vírus da Imunodeficiência Humana 1 (HIV-1)	gene <i>LTR</i>	DNA	10 cópias/mL	Não mencionado	24 min	Dispositivo microfluídico de fluorescência	Kong et al. 2019
	MERS-CoV	gene <i>NC</i>	RNA	10 cópias/μL	100%	3-7 min	Fluorescência em tempo real	El Wahed et al. 2013
	SARS-CoV2	gene <i>N</i>	RNA	7.74 cópias/reação	95%	20 min	Fluorescência em tempo real	Behrmann et al. 2020
	SARS-CoV2	gene <i>N</i>	RNA	7.659 cópias/μL	100%	20 min	SYBR Green I e faixa de fluxo lateral	Lau et al. 2021
	SARS-CoV-1	genes <i>RdRP</i> , <i>E</i> e <i>N</i>	RNA	gene RdRP: 2 cópias/reação; gene E: 15 cópias/reação; e	100%	15 min	Fluorescência em tempo real	Ahmed et al. 2021

Doenças	Doenças Bacterianas	Métodos de diagnóstico					Métodos de diagnóstico	
		Alvos	Tipos de amostra	Tipos de ácido nucleico	Sensibilidade	Especificidade	Tempo de análise	Referências
				gene N: 15 cópias/reação				
		Febre amarela (YFV)	região 5'-UTR	RNA	21 cópias/reação	100%	20 min	Fluorescência em tempo real e faixa de fluxo lateral Escadafal et al. 2014
		Zika vírus (ZIKV)	gene <i>protein E</i>	RNA	5 cópias/reação	100%	22 min	Fluorescência em tempo real Wand et al. 2018
		Vírus dengue (DENV)	região 3'-untranslated (UTR)	RNA	10 cópias/reação	100%	20 min	Fluorescência em tempo real Teoh et al. 2015
		Vírus ebola (EVD)	gene <i>EBOV NA</i>	RNA	10 cópias/reação	100%	20 min	Fluorescência em tempo real Yang et al. 2016
		<i>M. tuberculosis</i>	regiões IS6110 e IS1081	DNA	gene IS 6110: 6.25 fg/reação; e gene IS1081: 20 fg/reação gene IS6110: RPA - agarose e RPA-SYBER 0.05 e 0.5 ng, respectivamente. Gene IS1081: RPA - agarose e RPA - SYBER 0.00005 e 0.05 ng, respectivamente	100%	20 min	Fluorescência em tempo real Boyle et al. 2014
		<i>M. tuberculosis</i>	regiões IS6110 e IS1081	DNA		100%	15 min	Eletroforese em gel e SYBER Green I Singpanomchai et al. 2019
		<i>M. tuberculosis</i>	gene <i>Ag85B</i>	DNA	4 cópias/μL	100%	20 min	Fluorescência em tempo real Xu et al. 2020
		<i>Leptospira</i> sp.	gene <i>LipL32</i>	DNA	2 cópias/reação	100%	25 min	Fluorescência em tempo real Ahmed et al. 2014
		<i>Leptospira</i> sp.	gene <i>LipL32</i>	DNA	100 células/mL	100%	40 min	Fluorescência em tempo Jirawannaporn et al. 2022

								real e faixa de fluxo lateral
Doenças Parasitárias	<i>S. haematobium</i>	região Dra1	DNA	100 fg/reação	100%	10 min	Faixa de fluxo lateral	Rosser et al. 2015
	<i>S. haematobium</i>	região Dra1	DNA	1 fg/reação	Não mencionado	10 min	Fluorescência em tempo real	Rostron et al. 2019
	<i>S. japonicum</i>	gene <i>SjR2</i>	DNA	0.9 fg/reação	100%	20 min	Fluorescência em tempo real	Xing et al. 2017
	<i>P. falciparum</i>	gene 18S rRNA	DNA	4 cópias/reação	100%	10 min	Faixa de fluxo lateral	Kersting et al. 2014
	<i>Plasmodium</i> sp.	gene 18S rRNA	DNA	5 cópias/μL	Não mencionado	30 min	Faixa de fluxo lateral	Cordray e Richards- Kortum, 2015

vários estudos. Para melhorar o diagnóstico precoce e reduzir as taxas de mortalidade em bebês infectados por HIV em países de baixa renda, o uso de RPA a um dispositivo com enzimas liofilizadas foi relatado por Rohrman e Richards-Kortum. Os resultados obtidos no estudo apresentaram capacidade de amplificar 10 cópias de DNA de HIV para níveis detectáveis em 15 minutos (Rohrman; Richards-Kortum, 2012).

No ano seguinte, Boyle et al. desenvolveram um método utilizando a técnica RPA com diferentes temperaturas de incubação de 25 a 42 °C para o diagnóstico da principais subtipos de VIH-1 em bebês. Neste estudo, dois ensaios RPA direcionados a regiões distintas do genoma do HIV-1 (repetição terminal longa [LTR] e *pol*) foram selecionados e detectaram até 3 cópias de DNA proviral por reação em 20 min usando fluorescência e detecção de faixa de fluxo lateral. Em crianças infectadas pelo HIV com menos de 2 anos de idade, a capacidade de amplificar <10 cópias de DNA proviral fornece a sensibilidade para detectar HIV em uma gota de sangue (50 µL) de bebês, mesmo com baixas cargas virais. O *pol* e LTR os testes foram capazes de amplificar em 98,6% e 93%, respectivamente (Boyle et al. 2013). Posteriormente, Lillis et al. avaliaram o desempenho de um ensaio de HIV-1 usando RPA em uma faixa relativamente ampla de temperaturas de incubação, neste caso entre 30 e 43 °C. O tempo de incubação necessário foi de apenas 20 minutos na temperatura mais alta, com um aumento no tempo de incubação de 30 min na temperatura mais baixa de 30 °C, para compensar a redução cinética enzimática. Neste estudo foi possível detectar até a 10 cópias do DNA do HIV à temperatura ambiente (Lillis et al. 2014). Posteriormente, os mesmos autores realizaram um ensaio HIV-1 RPA e adicionou uma etapa de RT para permitir a detecção de RNA do HIV-1. Para determinar o LoD do ensaio, foram realizadas réplicas de oito reações em cada nível de entrada de cópia: 1000, 300, 200, 100, 30, 25, 10 e 1 cópia. Todas as reações com ≥ 30 cópias de RNA do HIV-1 foram positivas. Contudo, abaixo de 30 cópias/reação, a proporção de reações positivas diminuiu gradualmente em relação ao número de cópias. O ensaio RT-RPA do HIV-1 atingiu o pico de o sinal fluorescente em 10 min, com o LoD para a sequência correspondente ao RNA determinada em 30 cópias (Lillis et al. 2016).

Crannell e colaboradores realizaram ensaios de RPA para amplificar o DNA do HIV-1 usando o calor do corpo humano em quatro locais de incubação diferentes. Neste estudo, a axila foi identificada como a região de incubação ideal para esta reação. A especificidade e sensibilidade das reações RPA atingiu 100 cópias de DNA do HIV-1 em 9 de 10 reações com resultados positivos (Crannell et al. 2014). O calor do corpo humano também foi usado

para testes com RPA, que foi combinado com um dispositivo microfluídico para detecção de HIV. Neste estudo, um dispositivo microfluídico vestível foi desenvolvido para a detecção de DNA do HIV-1 via RPA, usando temperatura do corpo e um dispositivo baseado em telefone celular para detecção de fluorescência. Este dispositivo microfluídico foi construído com polidimetilsiloxano e imobilizado no pulso com isolamento térmico para reduzir a variação de temperatura. DNA do HIV-1 foi detectado a 100 cópias/mL dentro de 24 minutos. Estes resultados revelam-se mais favoráveis do que a PCR tradicional e outros métodos isotérmicos de amplificação de ácidos nucleicos em termos de tempo, portabilidade e independência elétrica em regiões com recursos limitados (Kong et al. 2019).

3.1.2 Doenças virais do trato respiratório

O diagnóstico de infecções do trato respiratório causadas por patógenos virais depende principalmente da técnica de PCR em tempo real de transcrição reversa (RT-qPCR) e das instalações para a realização desses exames ficam restritos a laboratórios especializados. No entanto, o desenvolvimento de tecnologias rápidas, sensíveis e ferramentas de diagnóstico portáteis podem ajudar a confirmar a infecção em pacientes suspeitos para selecionar o tratamento apropriado e conter a propagação do agente viral (Corman et al. 2012; Noh et al. 2018). Quando comparado ao RT-qPCR, o desempenho do ensaio isotérmico RT-RPA para detecção de RNA de MERS-CoV realizado por El Wahed e colaboradores foi semelhante ao da técnica em termos de sensibilidade e especificidade. O limite de detecção do ensaio RT RPA foi de 10 cópias/ μ L, o que indicou boa sensibilidade para identificação de MERS-CoV. O ensaio não obteve detecção cruzada de qualquer um dos RNAs de vários coronavírus e vírus respiratórios testados que afetam os humanos, incluindo o genoma humano (El Wahed et al. 2013).

O ensaio RT-RPA também foi testado para COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2. Behrmann et al. (2020) demonstraram a amplificação bem-sucedida de RNA transcrito *in vitro*, bem como RNA total de SARS-CoV-2 derivado de amostras de esfregaço de faringe e cultura de células sobrenadantes em volumes de apenas 6,2 μ L. O ensaio detectou uma sensibilidade de 7,74 cópias de RNA por reação e resultou em 95% probabilidade de detecção com tempo de execução de 20 min. Este ensaio não mostrou reatividade cruzada com outros vírus respiratórios. Em um estudo subsequente, um ensaio RT-RPA foi desenvolvido e otimizado para detecção rápida de SARS CoV-2 usando SYBR Green I e tiras de fluxo lateral. A sensibilidade analítica do ensaio foi testada utilizando RNA

diluído em série 10 vezes e especificidade com genoma RNA de outros vírus semelhantes. O LoD do ensaio RT-RPA para SARS-CoV-2 tinha 7.659 cópias de RNA em comparação com 5 cópias/ μ L de RT-PCR, sem apresentar reatividade. De acordo com os autores, embora os testes apresentem uma ligeira diferença sensibilidade, o RT-RPA oferece uma alternativa viável para a detecção de SARS-CoV usando tiras de fluxo laterais em áreas com infraestrutura limitada (Lau et al. 2021). Wahed et al. (2021) avaliaram um método para detectar os genes de RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), proteína do envelope (E) e proteína do nucleocapsídeo (N) do SARS-CoV-2 com base no ensaio RT-RPA. Os ensaios RT-RPA para RdRP, E e N precisaram de aproximadamente 15 minutos para amplificar 2, 10, e 15 moléculas de RNA por reação, respectivamente. Os ensaios RT-RPA para RdRP e E detectaram SARS-CoV-1 e RNA genômico do SARS-CoV-2, enquanto o ensaio N identificou apenas RNA SARS-CoV-2. Nenhum dos ensaios estabelecidos mostrou reatividade cruzada com ácidos nucleicos de outros patógenos respiratórios.

3.1.3 Doenças virais transmitidas por vetores

O diagnóstico laboratorial de doenças virais emergentes apresenta vários desafios. As reações sorológicas cruzadas foram descritas em doenças causadas por flavivírus, como vírus da dengue, vírus Zika e vírus da febre amarela. A técnica de RT-PCR e RT-qPCR, que são as duas mais comumente utilizadas para essas doenças, exigem o uso de instrumentos complexos e laboratórios bem equipados (Elston et al. 2017; Weidmann et al. 2010). Para superar estes problemas, utilizando a técnica RT-RPA em tempo real com um instrumento portátil de scanner de tubo, Escadafal et al. (2014) avaliaram a sensibilidade e especificidade analítica do RNA do vírus da febre amarela (YFV). O teste foi desenvolvido em três formatos diferentes (tempo real com ou sem sistema microfluídico, semiautomático e testes de fluxo lateral) para avaliar sua aplicação para diferentes propósitos. A especificidade analítica e a sensibilidade foram avaliadas usando um grande painel de vírus e diluições em série de RNA do YFV. O ensaio obteve um LoD de aproximadamente 21 cópias/reação equivalentes ao genoma em 20 min. sem reatividade cruzada com outros vírus relacionados. Com base nesses resultados, os autores demonstraram que o método tem bom potencial para diagnóstico molecular no local de atendimento, em um ambiente laboratorial básico, ou num centro de saúde rural (Escadafal et al. 2014).

Testes RT-RPA também foram descritos para detecção do vírus Zika (ZIKV) em diferentes localizações geográficas. Para investigar a sensibilidade do ensaio, fragmentos de RNA sintético representando cinco cepas diferentes de ZIKV estavam preparados. Uma série de 10 diluições do RNA sintético fragmento foi preparado e cada diluição foi testada usando o ensaio ZIKV RT-RPA. O ensaio provou ser altamente sensível e pode detectar até 5 cópias de RNA por reação em 22 min em três de cinco repetições, enquanto essas amostras não foram detectadas por RT-PCR, embora tenham obtido 100% de especificidade para ZIKV. (Vasileva Wand et al. 2018). Em paralelo com a técnica de RT-PCR, outro grupo de estudo mostrou que RT-RPA pode detectar alvos de RNA para vírus da dengue e vírus Ebola. O ensaio RT-RPA para o vírus da dengue detectou um LoD de apenas 10 cópias de RNA por reação em menos de 20 minutos. Os primers RT-RPA projetados e sonda exo detectaram o genoma do vírus da dengue em pelo menos 12 genótipos sem reação cruzada com outros arbovírus (Teoh et al. 2015). Para o vírus Ebola, o ensaio RT-RPA foi desenvolvido em um painel de 375 amostras e demonstrou desempenho adequado do ensaio para o diagnóstico rápido do vírus Ebola. O ensaio RT-RPA mostrou 97% de sensibilidade e 97% de especificidade para todas as amostras testadas. Para analisar o limite de detecção do ensaio foram utilizadas 10 diluições seriadas de RNA variando de 10^8 a 10^1 moléculas/ μ L foram testados em oito repetições. Após a otimização, a reação detectou apenas 10 cópias/reação em 20 min (Yang et al. 2016).

3.2. RPA para detecção de doenças bacterianas

As doenças infecciosas causadas por bactérias são por vezes difícil de identificar devido às características biológicas específicas estágios de cada patógeno, nos quais a concentração é muito baixo para ser detectado pelo sistema imunológico (Yu et al. 2019). Como o RPA tem excelente sensibilidade ao DNA de baixo nível, tentativas foram feitas para diagnosticar patógenos em doenças bacterianas.

3.2.1 Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pela bactéria da espécie *Mycobacterium tuberculosis*, e muitas vezes sua o diagnóstico pode ser complicado. Microscopia de baciloscopia de escarro é o principal teste utilizado para o diagnóstico de tuberculose pulmonar e é realizado utilizando múltiplas culturas de *M. tuberculosis* em amostras de escarro obtidas de pacientes. Este teste é trabalhoso, não particularmente

sensível e leva um tempo relativamente longo (2–6 semanas) para ser concluído. Em contraste, a quantificação do DNA do *M. tuberculosis* por PCR é um método eficaz para o diagnóstico da tuberculose e indica a presença de resistência ao tratamento antituberculose. No entanto, em países com um elevado fardo de tuberculose, os testes baseados em PCR são restritos a laboratórios centralizados e ambientes de pesquisa especializados (Abebe et al. 2011; McNerney e Daley 2011). Assim, ensaios foram desenvolvidos para mostrar o potencial da RPA como uma ferramenta diagnóstica acessível para detecção de tuberculose em amostras contendo um baixo número de bactérias em pouco tempo.

Boyle et al. (2014) demonstraram um ensaio RPA com a capacidade de detectar DNA de *M. tuberculosis* com alto grau de sensibilidade dentro de um tempo de reação inferior a 20 min. Foram selecionados dois alvos específicos para *M. tuberculosis*, IS6110 e IS1081. Ao testar DNA genômico purificado de *M. tuberculosis*, LoDs de 6,25 fg por 100 µL de reação (IS6110) e 20 fg de DNA genômico (IS1081) foram consistentemente alcançados. Ao testar uma amostra de pulmão de amostras de pacientes com suspeita de tuberculose, o RPA demonstrou uma precisão superior à da microscopia de fluorescência. A especificidade das reações para IS6110 e IS1081 foram testados usando amostras de DNA de um painel de 23 micobactérias não tuberculosas. Sem sinal foi obtido a partir do DNA bacteriano, indicando alta especificidade dos primers utilizados nos testes. Usando os mesmos alvos (IS6110 e IS1081), Singpanomchai et al. (2019) realizaram um ensaio utilizando RPA e compararam com PCR convencional. Após amplificação usando RPA, os amplicons foram examinados usando eletroforese em gel de agarose e SYBER Green I. Para determinar o LoD do ensaio RPA, o DNA genômico extraído foi diluído em série 10 vezes de 5 a 0,00005 ng. Os LoDs para IS6110 RPA-agarose e RPA-SYBER foram 0,05 e 0,5 ng, respectivamente, e os LoDs para IS1081 RPA-agarose e RPA-SYBER foram 0,00005 e 0,05 ng, respectivamente. A sensibilidade da técnica RPA foi maior quando projetada em tempo real para identificar *M. tuberculosis*, com o Antígeno 85B (Ag85B) como alvo específico. Foi possível identificar eficazmente *M. tuberculosis* com um LoD de 4 cópias/mL, mas não demonstrou sinal positivo para DNA genômico de outras micobactérias ou patógenos (Xu et al. 2021).

3.2.2 Leptospirose

A leptospirose é uma doença causada pela bactéria *Leptospira*. Na maioria dos casos, esta doença é diagnosticada através de métodos sorológicos ou moleculares, como o exame microscópico, teste de aglutinação (MAT) e PCR, respectivamente. Sorologia não contribui para o diagnóstico precoce da doença porque os anticorpos contra *Leptospira* só são detectáveis 3–5 dias após o início da infecção e testes moleculares baseados em PCR diagnósticos são caros e se tornaram um problema financeiro problema em países de baixa e média renda onde a doença é endêmica (Levett 2001). No entanto, o teste de RPA desenvolvido por Ahmed et al. (2014) é robusto para a detecção de *Leptospira* no diagnóstico clínico. Neste estudo, menos de duas cópias foram detectadas na reação com DNA genômico em 25 min. Os resultados do ensaio revelaram alta sensibilidade e especificidade em comparação com os métodos de referência para detecção da leptospirose.

Recentemente, um ensaio RPA combinando fluorescência CRISPR/Cas12a foi projetado para detectar o gene *lipL32* de *Leptospira* sp. de amostras de DNA coletadas de pacientes. Diluições em série de DNA genômico foram preparadas a partir de 10⁶ a 1 células/mL para analisar a sensibilidade analítica do ensaio. Os ensaios demonstraram um LoD de 100 células/mL, conforme determinado pela detecção do sinal fluorescente. Esse método não demonstrou nenhuma reatividade cruzada contra uma série de outras doenças febris agudas. O desempenho clínico foi validado usando DNA extraído de 110 clínicas amostras e comparadas com os resultados da detecção qPCR de *Leptospira* sp. O ensaio RPA-CRISPR/Cas12a mostrou sensibilidade de 85,2%, especificidade de 100% e precisão de 92,7%. Além disso, o estudo apresentou um fluxo lateral combinado ensaio de detecção com RPA-CRISPR/Cas12a, que também tinha um LoD de 102 células/mL e foi capaz de distinguir corretamente entre amostras clínicas positivas e negativas (Jirawannaporn et al. 2022).

3.3. RPA para detecção de doenças parasitárias

Parasitas são organismos que têm um impacto importante sobre a saúde pública em todo o mundo. A gravidade clínica e o resultado das doenças parasitárias geralmente dependem da condição do hospedeiro. estado imunológico (Theel e Pritt 2016). A maioria dos métodos destinados à detecção de parasitas permanecem impraticáveis para uso em ambientes endêmicos e regiões com recursos limitados (Castellanos-Gonzalez et al. 2018).

Ensaio com RPA foram desenvolvidos para o diagnóstico de doenças infecciosas parasitárias, identificação de níveis de espécies e como guia para determinar o tratamento adequado para os pacientes; portanto, está se tornando uma importante ferramenta em exames de campo para detecção e controle deste tipo de doença.

3.3.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença tropical causada por parasitos do gênero *Schistosoma* conhecidos como esquistossomos. Atualmente, vários métodos para diagnóstico e vigilância da esquistossomose estão disponíveis, incluindo técnicas parasitológicas e técnicas imunológicas e métodos moleculares; no entanto, nenhum apresenta características de desempenho ideais para aplicações específicas, sensíveis e práticas para diagnóstico no local de atendimento (Pai et al. 2012). Devido aos seus baixos requisitos de recursos, o RPA é um sistema alternativo para amplificar o DNA do *Schistosoma* em ambientes endêmicos. Inicialmente, o ensaio RPA foi adaptado para *Schistosoma haematobium* usando tiras de fluxo lateral. O ensaio RPA amplificou a região Dra1 de *S. haematobium*, e a amplificação foi facilmente detectada por um método colorimétrico semiquantitativo através da mudança nas faixas de fluxo laterais. O ensaio mostrou um LoD de 100 fg de DNA, e a amplificação cruzada ocorreu com outras espécies de *Schistosoma*, mas não com outros microrganismos (Rosser et al. 2015). Posteriormente, Rostron et al. (2019) demonstraram que RPA em tempo real pode fornecer uma alternativa de solução eficiente para a detecção de *S. haematobium* usando um ensaio RPA fluorescente em tempo real com amostras de urina de pacientes. Visando a região de repetição genômica Dra1, o ensaio atingiu um LoD de 1 fg de DNA em 10 minutos usando um dispositivo de scanner de tubo portátil alimentado por bateria que detectou DNA por fluorescência durante o processo de reação.

Usando amostras de fezes de pacientes infectados, Xing et al. (2017) demonstraram melhor sensibilidade ao *Schistosoma japonicum* usando RPA em tempo real. O ensaio para *S. japonicum* foi desenvolvido para atingir o gene retrotrans poson altamente repetitivo (SjR2), e sua sensibilidade foi avaliada por testes seriados diluição do DNA genômico de *S. japonicum* e sua especificidade usando outro DNA genômico de vermes relacionados. Clínico A análise por RPA foi avaliada pela primeira vez em 60 amostras fecais de pacientes infectados e saudáveis e depois comparados com outros testes de diagnóstico em 200 indivíduos de alto risco que vivem em áreas endêmicas. Análise de amostras de fezes de 30

infectados pacientes e 30 indivíduos saudáveis indicaram uma sensibilidade e especificidade de 100%. Ao testar 200 amostras fecais ou séricas amostras de uma população de alto risco, a sensibilidade percentual da RPA foi de 100%. O LoD do ensaio foi avaliado em 0,9 fg DNA por reação, o que é semelhante ao de PCR em tempo real.

3.3.2 Malária

A malária é uma doença infecciosa tropical causada por *Plasmodium* sp. parasita é comumente confirmado usando microscopia convencional, que requer equipamentos caros, reagentes e profissionais treinados (Dip Gandarilla et al. 2021; Kattenberg et al. 2011). Testes de diagnóstico rápido (RDTs) são baseados no biomarcador para detecção de *Plasmodium* (geralmente antígenos) e oferecem vantagens como baixo custo, curto tempo de análise e mão de obra não qualificada. No entanto, os RDT carecem de elevada sensibilidade, por vezes fornecem resultados pouco claros e podem ser afetados pela temperatura e condições de armazenamento (Chiodini et al. 2007). Testes molecular, como a PCR, têm a vantagem de detectar baixos níveis de parasitemia e alta especificidade para determinação da espécie *Plasmodium*; no entanto, é difícil implementá-lo em um dispositivo para testes em ambientes com poucos recursos (Johnston et al. 2006). Neste contexto, o ensaio RPA pode fornecer uma ferramenta alternativa para avaliar infecções parasitárias de baixo nível em humanos causadas por espécies de *Plasmodium*.

Um ensaio RPA para *Plasmodium falciparum*, que teve como alvo um fragmento específico do gene 18S rRNA, foi acoplado com um ensaio de fluxo lateral e exibiu alta sensibilidade e especificidade. Todas as cepas investigadas de *P. falciparum* (n = 77) testaram positivo (100%), enquanto todas as 11 amostras testadas não-*Plasmodium* (100%) apresentaram resultados negativos. Neste estudo, 100 fg de DNA genômico foi detectado, o que correspondeu a um LoD de 4 parasitas por reação em 10 min. Os autores demonstraram que a reação pode ser realizada na presença de contaminantes com outras espécies de *Plasmodium* ou outras cepas de protozoários (Kersting et al. 2014). Posteriormente, o RPA foi implementado em um dispositivo integrado que poderia realizar amplificação isotérmica para detecção de fluxo lateral do produto resultante. O dispositivo de papel e plástico foi desenvolvido para desempenhar três funções principais: (1) amplificar o alvo usando RPA, (2) diluir o resultado produto e (3) detectar o produto usando um fluxo lateral no ensaio de sanduíche. Além disso, o dispositivo pode transferir o produto entre a amplificação, diluição e detecção. Usando cópias sintéticas do gene 18S rRNA em quatro espécies de *Plasmodium*

que infectam humanos, o dispositivo foi capaz de detectar 5 cópias/ μ L de DNA sintético de Plasmodium em menos de 30 minutos. De acordo com os resultados, a sensibilidade do ensaio foi semelhante à de outros métodos isotérmicos de amplificação e microscopia óptica (Cordray e Richards-Kortum 2015).

4. Outras aplicações de RPA

O uso da RPA para diagnóstico clínico em humanos tem sido amplamente discutidos nas seções anteriores. Além disso, o RPA pode ser aplicado como um método para a detecção de patógenos em outros organismos. Portanto, nas seções seguintes, apresentamos algumas dessas aplicações, incluindo a detecção de vários patógenos em plantas, animais e alimentos (Tabela 2).

4.1. Aplicações agrícolas

O desenvolvimento de uma abordagem rápida, específica e sensível no método diagnóstico é importante para o manejo de doenças nas plantas e para controlar a propagação de patógenos (López et al. 2009). Métodos moleculares baseados na PCR desempenham um papel fundamental na agricultura moderna, protegendo as culturas e aumentando os rendimentos agrícolas. No entanto, esses métodos requerem estruturas laboratoriais caras e tempos de reação prolongados, que desencorajam a sua implementação em clínicas de doenças de plantas (Khiyami et al. 2014). Por outro lado, a aplicação do RPA é simples, portátil e ágil ao ensaio, melhorando assim a custo-benefício do diagnóstico em campo da planta doentes (Babu et al. 2018).

Vários ensaios de RPA foram relatados para o efeito direto de detecção de patógenos de extratos brutos em diferentes amostras infectadas. Por exemplo, um ensaio baseado em RPA, chamado RT-RPA direto, foi capaz de detectar o vírus mosaico de Yam (YMV) e vírus do mosaico leve do Yam (YMMV) diretamente a partir de extratos vegetais brutos de material de inhame infectado em menos de 30 minutos. Para detectar YMV e YMMV em extratos brutos de planta infectada, um polietilenoglicol alcalino modificado (PEG) método de extração foi utilizado para lise eficaz de células vegetais. Diluições em série dos extratos vegetais brutos infectados foram testados quanto aos limites de detecção. YMV foi detectado até diluição 10^{-3} , enquanto para YMMV, apenas 10^{-1} diluições foram consistentemente detectadas. A especificidade foi confirmada por ensaios de reação cruzada utilizando os iniciadores YMV

Tabela 2: Uso da Amplificação da Polimerase Recombinase (RPA) em outras aplicações.

RPA no diagnóstico clínico	Amostra	Alvo	Gene alvo	Molécula	LoD	Especificidade	Tempo de ensaio	Método de detecção	Referências
Agricultura	Inhame	<i>Yam mosaic virus</i> (YMV) e <i>Yam mild mosaic virus</i> (YMMV)	gene YMV: CP; e YMMV: região 3' UTR	RNA	YMV detecção abaixo de 1×10^{-3} ; Para YMMV, 10^{-1}	100%	30 min	Fluorescência em tempo real	Silva et al. 2018
	Tomate, tabaco e feijão	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	gene <i>CI</i>	DNA	9.6×10^{-12} diluição/reacção	Não mencionado	30 min	Eletroforose em gel de agarose	Londoño et al. 2016
	Soja	<i>P. sojae</i>	gene <i>Ypt1</i>	DNA	10 pg/reacção	100%	20 min	Faixa de fluxo lateral	Dai et al. 2019
	Plantas feijão-caupi	<i>Milk vetch dwarf virus</i> (MDV)	gene <i>CP</i>	ssDNA	101 cópias/reacção	100%	30 min	Faixa de fluxo lateral	Cao et al. 2020
	Cereja	<i>Little cherry virus 2</i> (LChV2)	gene <i>CP</i>	RNA	1:100 diluição do extrato bruto da folha	100%	15 min	Faixa de fluxo lateral	Mekuria et al. 2014
	Culturas lenhosas perenes	<i>Plum pox virus</i> (PPV)	região <i>PPV-D</i>	RNA	10^4 diluição/reacção	100%	20 min	Faixa de fluxo lateral	Zhang et al. 2014
	Arroz	<i>Rice black-streaked dwarf virus</i> (RBSDV)	gene <i>P10</i>	RNA	10 diluição/reacção	100%	20 min	Fluorescência em tempo real e faixa de fluxo lateral	Zhao et al. 2019
Veterinária	Gato	<i>Feline herpesvirus 1</i> (FHV-1)	gene <i>TK</i>	dsDNA	10^2 cópias/reacção	100%	20 min	Fluorescência em tempo real	Wang et al. 2017

Frango	<i>Avian reovirus</i> (ARV)	gene <i>S1</i>	RNA	102 cópias/mL	100%	20 min	Fluorescência em tempo real	Ma et al. 2020
Ovelhas e cabras	<i>M. ovipneumoniae</i>	gene <i>16S rRNA</i>	DNA	1.0×10^1 cópias/reação	100%	15 min	Fluorescência em tempo real e faixa de fluxo lateral	Wang et al. 2020
Cachorro	<i>Babesia gibsoni</i>	gene <i>Cox I</i>	DNA	0.5 parasitas/ μ L	100%	20 - 30 min	Faixa de fluxo lateral	Cui et al. 2018
Cachorro	<i>Canine parvovirus</i> <i>type 2</i> (CPV-2)	gene <i>VP2</i>	ssDNA	10^2 cópias/reação	100%	10-40 min	Eletroforese em gel de agarose	Wang et al. 2016
Bovino	<i>Bovine</i> <i>rhinotracheitis virus</i> (IBRV)	região UL52	DNA/R NA	5 cópias/reação	100%	25 min	Faixa de fluxo lateral	Hou et al. 2017
Felinos	<i>Feline parvovirus</i> (FPV)	gene <i>VP2</i>	DNA	10 cópias/reação	100%	15 min	Faixa de fluxo lateral	Wang et al. 2019
Camundo ngo	<i>Murine norovirus</i> (MNV)	região ORF1- ORF2	RNA	1.0×10^2 cópias/reação	100%	20 min	Fluorescência em tempo real e por eletroforese em gel	Ma et al. 2018

Monitoramento da segurança alimentar	Leite	<i>S. Typhimurium</i>	gene <i>invA</i>	DNA	1 fg/reação	100%	10 min	Faixa de fluxo lateral	Hu et al. 2019
	Amostras de alimentos	<i>Salmonella</i> sp.	gene <i>fimY</i>	DNA	12 CFU/mL em cultura pura e 1.29×10 ² CFU/mL em amostra contaminada artificialmente	100%	10 min	Faixa de fluxo lateral	Li et al. 2020
	Amostras de alimentos	<i>Salmonella</i> sp.	gene <i>invA</i>	DNA	20 fg/reação	100%	20 min	Faixa de fluxo lateral	Liu et al. 2017
	Amostras de alimentos	<i>Salmonella</i> sp.	gene <i>invA</i>	DNA	1.1 × 10 ¹ fg/reação	100%	15 - 20 min	Fluorescência em tempo real e por faixa de fluxo lateral	Zhao et al. 2021
	Leite	<i>S. enterica</i> , <i>E. coli</i> O157: H7 e <i>V. parahaemolyticus</i>	gene <i>InvA</i> de <i>S. enterica</i> ; gene <i>fliC</i> de <i>E. coli</i> ; e gene <i>MutS</i> de <i>V. parahaemolyticus</i>	DNA	4 cópias/reação	100%	30 min	Fluorescência em tempo real	Choi et al. 2016
	Amostras de alimentos	<i>Salmonella</i> sp.	genes <i>HNS</i> , <i>oriC</i> e <i>STM4057</i>	DNA	24 cópias/mL	100%	40 min	Fluorescência em tempo real e formato microarray	Santiago-Felipe et al. 2014
	Amostras de alimentos	<i>Salmonella enterica</i>	gene <i>invA</i>	DNA	6 UFC/mL	100%	1. 5 horas	Eletroforese em gel de agarose	Zhang et al. 2019
	Amostra de leite sintético	<i>Salmonella</i> sp.	gene <i>invA</i>	DNA	3 UFC/mL	100%	6 horas	Ensaio de fotosensibilização colorimétrica	Li et al. 2021

Frutos do mar	<i>V. parahaemolyticus</i>	região <i>gyrB</i>	DNA	1.02×10^2 cópias/reação	100%	20 min	Fluorescência em tempo real	Geng et al. 2019
Ostras	<i>V. parahaemolyticus</i>	gene <i>toxR</i>	DNA	10 pg/reação	100%	15 min	Faixa de fluxo lateral	Jiang et al. 2020
Amostras de alimentos	<i>L. monocytogenes</i>	gene <i>hlyA</i>	DNA	1.1 pg / μL	Não mencionado	40 min	Faixa de fluxo lateral	Azinheiro et al. 2020

e YMMV e sondas em amostras positivas para YMMV e YMV, respectivamente. Nenhuma reação cruzada ocorreu para nenhuma das amostras, indicando a alta especificidade dos primers e sondas usado para cada alvo específico (Silva et al. 2018).

Em outro estudo, os autores desenvolveram um ensaio com RPA capaz de detectar especificamente vírus curl da folha amarela de tomate (TYLCV) usando extrato bruto de tomate infectado e uma metodologia de extração simples e barata. O DNA foi extraído de amostras frescas, congeladas e secas folhas de *P. vulgaris*, *N. tabacum* e *S. lycopersicum*. Depois da amplificação, amplicons do tamanho esperado foram gerados a partir de 11 das 13 amostras de campo usando o primer par TYL828F/TYL834R; esses resultados foram idênticos àqueles obtidos por PCR utilizando o mesmo par de primers. O ensaio teve uma sensibilidade de detecção tão baixa quanto $9,6 \times 10^{-12}$ g de DNA de TYLCV usando um extrato bruto e 9,6 pg de DNA de TYLCV purificado (Londoño et al. 2016). Baseado em ensaios em RPA combinado com visualização da faixa de fluxo lateral tornaram-se tecnologias promissoras para a detecção de patógenos de plantas devido à sua velocidade e sensibilidade incluindo ensaios para vírus *Phytophthora* sp. na soja e *Phytophthora hibernalis* em pomelo (*Citrus maxima*). Ambos os ensaios apresentaram uma abordagem em duas etapas; o primeiro, consistiu na amplificação do gene alvo (Ypt1) de *P. sojae* e *P. hibernalis*, enquanto na segunda etapa, a detecção e visualização de amplicons RPA foram realizadas usando tiras de fluxo lateral. Essas abordagens alcançaram um LoD de 10 pg e 0,2 ng de DNA genômico de *P. sojae* e *P. hibernalis*, respectivamente (Dai et al. 2019). Abordagens semelhantes usando RPA combinada com método de fluxo lateral foi descrito para a detecção de patógenos no vírus anão da ervilhaca leiteira (MDV) (Cao et al. 2020), cereja (Mekuria et al. 2014), ameixa (Zhang et al. 2014) e arroz (Zhao et al. 2019).

4.2. Aplicações veterinárias

O diagnóstico precoce e rápido é crucial para prevenir e controlar a propagação de doenças nos animais. Vários grupos de pesquisa usaram as vantagens da técnica RPA para projetar testes de diagnóstico para vários alvos patogênicos virais, bacterianos e parasitários em animais. Por exemplo, Wang et al. (2020) usaram RT-RPA para identificar o vírus da cinomose canina (CDV). Usando primers e uma sonda exo para atingir o gene da proteína do nucleocapsídeo, os ensaios alcançaram uma alta especificidade e sensibilidade de 31,8 cópias de RNA, que é 10 vezes mais sensível que o RT-PCR. Um ensaio para detectar a infecção por reovírus aviário (ARV) em galinhas usando RT-RPA baseada em sonda

também foi desenvolvida. O ensaio foi realizado a uma temperatura constante de 39 °C, com amplificação em 20 min, e o LoD foi de 102 cópias/μL. Além disso, quando os ácidos nucleicos de patógenos de outras aves comuns foram submetidos ao teste RT-RPA, apenas ARV testou positivo, exibindo especificidade notável. O ensaio de campo RT RPA foi realizado utilizando 86 amostras clínicas. Os resultados da detecção por RT-RPA concordaram com os de qRT-RPA a um nível de 96,5% (Ma et al. 2020).

Além disso, foram desenvolvidos ensaios utilizando RPA combinado com uma tira de fluxo lateral, permitindo ensaios altamente específicos e sensíveis para detecção em amostras clínicas de animais, incluindo amostras de ruminantes e cães. Por exemplo, Wang et al. (2020) propuseram ensaios comparativos de RPA em tempo real e RPA com faixa de fluxo lateral para detectar *Mycoplasma ovipneumoniae* em ruminantes infectados. Para gerar um DNA padrão de *M. ovipneumoniae* para ensaios RPA, um produto de PCR contendo a região de interesse do gene 16S rRNA foi amplificado do DNA de *M. ovipneumoniae* e clonado no plasmídeo pMD19-T. O resultado do plasmídeo, pMO-16SrRNA, foi transformado em células de *Escherichia coli* DH5a. O LoD do ensaio foi de 101 cópias/reação, o que foi 10 vezes inferior ao limite de detecção de os ensaios RPA e PCR em tempo real. Ambos os ensaios eram altamente específicos para *M. ovipneumoniae*, pois não havia reações cruzadas com outros microrganismos testados. Cui et al. (2018) usaram a mesma abordagem baseada em RPA combinada com o método de fluxo lateral para detectar DNA do parasita *Babesia gibsoni* em amostras de cães infectados em regiões endêmicas áreas da China. DNA foi extraído de amostras de sangue coletados de cães em clínicas veterinárias potencialmente infectado com *B. gibsoni*. Neste estudo, a combinação de ARP com fluxo lateral permitiu aos autores confirmarem alta sensibilidade, com um LoD de 0,5 parasitas/μL em amostras de sangue infectadas, o que indica que é 20 vezes mais sensível que o PCR convencional e não apresenta reatividade cruzada com outros testes de DNA.

Os testes para detecção do circovírus suíno 2 (PCV-2) foram realizados usando RT-RPA. Neste estudo, o DNA genômico de PCV-2 foi diluído em séries de 10 para atingir concentrações de DNA variando de 106 a 100 cópias/μL. Um microlitro de cada diluição de DNA foi usado para a amplificação de RPA. Os resultados mostraram que o LoD do ensaio RPA foi 102 cópias/reação. Além disso, o RPA apresentou uma sensibilidade semelhante ao RT-PCR; no entanto, foi 10 vezes mais sensível que o PCR convencional. O ensaio mostrou alta especificidade, com taxa de concordância diagnóstica de 93,7% com PCR convencional e 100% com RT-PCR (Wang et al. 2016b). Um ensaio para detectar o vírus do herpes bovino

1 (IBRV) em amostras bovinas infectadas foram desenvolvidas usando RPA com detecção de fluxo lateral. Os iniciadores e a sonda RPA foram construídos para atingir o fragmento conservado específico da região UL52 do IBRV. A detecção foi realizada a uma temperatura constante de 38 °C durante 25 min, e os produtos de amplificação foram facilmente visualizados em uma tira simples. O limite de detecção deste ensaio foi de cinco cópias por reação de DNA do IBRV, e não houve reatividade cruzada com outros vírus que causam infecções gastrointestinais e respiratórias em bovinos ou outros vírus pes (Hou et al. 2017).

Além disso, Wang et al. (2019) desenvolveram um RT-RPA ensaio para detecção de ácido nucleico de parvovírus felino (FPV) de DNA viral de amostras clínicas. A maioria condição de reação adequada para o ensaio foi 38 °C para 15 minutos. Para investigar a sensibilidade do sistema, o pEB VP2 foi diluído em uma série de 10 para atingir concentrações de DNA variando de 105 a 100 cópias/μL. O ensaio poderia detectar 102 cópias do ácido nucleico alvo por reação e foi mais sensível que a PCR tradicional. RT-RPA também foi capaz de detectar o norovírus murino (MNV), que é o patógeno viral mais prevalente em colônias de camundongos. O conjunto primer-sonda foi projetado com base em sequências de junção ORF1 – ORF2 altamente conservadas. A reação foi realizada em um bloco de aquecimento e incubada a 39 °C por 20 min. Para avaliar o LoD do ensaio RT-RPA, os padrões de RNA foram diluídos em uma série de 10. A faixa de detecção dinâmica do ensaio foi de 106–102 cópias/reação, indicando que a detecção do ensaio o limite era de 102 cópias/μL de RNA molecular. O ensaio foi específico porque não houve reação cruzada com outros vírus murinos comuns (Ma et al. 2018).

4.3. Monitoramento da segurança alimentar

A gestão da segurança alimentar depende de uma detecção eficaz de métodos para prevenir doenças causadas pela contaminação por organismos patogênicos. Portanto, para garantir a segurança alimentar, é necessário estabelecer a ausência de patógenos ou toxinas nos alimentos, monitorar a eficácia do processamento higiênico, e verificar a qualidade do produto (Law et al. 2014; Lee et al. 2014). Esforços também foram feitos para desenvolver ensaios RPA para monitoramento de patógenos de origem alimentar. Diferentes ensaios têm sido desenvolvidos para identificar *Salmonella* usando RPA, incluindo ensaios de detecção combinando RPA com tiras de fluxo laterais, que demonstrou melhor sensibilidade em comparação com o ensaio de PCR convencional.

Hu et al. (2019) desenvolveram um ensaio combinando RPA com tiras de fluxo laterais para detecção de *Salmonella Typhimurium* em amostras de leite inoculadas artificialmente. O volume mínimo, o menor tempo e a temperatura ideal para a reação RPA foram 10 µL, 10 min e 40–42 °C, respectivamente. O LoD do ensaio foi de 1,95 UFC/mL, o que é 10 vezes mais sensível que PCR convencional. Testes com 29 outras bactérias de origem alimentar como controles revelou que o ensaio era altamente específico para *Salmonella Typhimurium*. No ano seguinte, Li et al. (2020) desenvolveram um imunoenensaio de fluxo lateral combinado com RPA para a detecção de *Salmonella* em alimentos. O fragmento conservado fimY foi selecionado como gene alvo para o julgamento. Em condições ideais (37 °C, 10 min), a sensibilidade foi de 12 UFC/mL em cultura pura, e as concentrações tão baixo quanto 1,29 10² UFC/mL em contaminados artificialmente amostras. Testes com 16 cepas não-*Salmonella* como controles revelou que o ensaio é específico para o gene fimY de *Salmonella*.

Liu et al. (2017) utilizaram RPA com faixas de fluxo laterais para *Salmonella* para atingir o gene da proteína de invasão A (invA). O par de primers com modificações foram projetados: um primer com digoxina e outro com biotina. Na presença dos primers modificados, o RPA produziu uma quantidade substancial de DNA duplex ligado à biotina e digoxina. O ensaio desenvolvido permitiu a detecção de DNA genômico em menos de 20 min e foi altamente sensível com um LoD tão baixo quanto 20 fg de DNA alvo. Nenhuma reação cruzada foi observada, e o ensaio foi específico para detecção de bactérias *Salmonella*. Em outro estudo, a sequência do gene invA para detectar *Salmonella* spp. foi usado por Zhao et al. (2021) em um teste com RPA em tempo real e tiras de fluxo lateral. O RPA em tempo real foi realizado usando um scanner fluorescente portátil a 39 °C por 20 min, enquanto RPA com tiras de fluxo laterais foi realizada em bloco incubador a 39°C por 15 min. O LoD alcançado pelo RPA em tempo real foi de 1,1×10¹fg, o que foi 10 vezes mais sensível que o ensaio RPA com tiras de fluxo lateral. Sem reatividade cruzada com outros patógenos foi observado em qualquer um dos ensaios.

Choi et al. (2016) desenvolveram um microdispositivo centrífugo para realizar ensaios de amplificação RPA e identificação multiplex em tempo real de amostras de leite contaminadas com bactérias de intoxicação alimentar. InvA, fliC e MutS foram selecionados como genes-alvo das bactérias que causam intoxicação alimentar em *S. enterica*, *E. coli* O157: H7 e *V. parahaemolyticus*, respectivamente. O microdispositivo foi projetado para conter unidades funcionais triplicadas idênticas, e cada unidade tinha quatro câmaras de

reação, o que possibilitou a realização de 12 reações RPA simultaneamente. O microdispositivo integrado consistia em duas camadas: a camada superior era reagente RPA e as amostras de leite contaminadas foram carregados nos reservatórios de amostra na camada inferior. O todo o processo foi realizado usando um analisador genético portátil personalizado e um detector óptico miniaturizado. O ensaio alcançou uma sensibilidade de detecção de 4 células por 3,2 μ L de amostra de leite em 30 min. Numa outra abordagem, uma abordagem com sensor integrado, incluindo amplificação por RPA e detecção em um formato microarray usando tecnologia de disco compacto, foi desenvolvido. O ensaio foi projetado para detectar simultaneamente três genes: *hns* e *oriC* para *Salmonella* spp., e STM4057 para a detecção específica da subespécie de *Salmonella*. Primers foram imobilizados na superfície de policarbonato de discos versáteis digital (DVD) e identificação multiplexada de cada produto foi realizada por varredura óptica a laser do Unidade de DVD por 40 min. O LoD foi de 0,12–0,15 ng/mL, equivalente para 24–30 cópias/mL (Santiago-Felipe et al. 2014).

Em um estudo de Zhang et al. (2019), RPA foi combinado com um biossensor para detectar *Salmonella enterica*. O ensaio RDTG foi baseado em RPA, clivagem de enzima específica de duplex (DSN), extensão da desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) e saída dos G-quadruplexes. Este biossensor RDTG apresentou um LoD de <6 UFC/mL em menos de 1,5 h. Outro estudo desenvolvido para diagnóstico de *Salmonella* sp. usando o método RPA combinado com um ensaio colorimétrico de fotossensibilização. O produto amplificado, referente ao gene *invA* do DNA genômico de *Salmonella* spp., foi amplificado e posteriormente quantificado usando um método colorimétrico. O método proposto ofereceu um LoD de 3 UFC/mL em um período de 6 h após o acoplamento com bactérias pré-enriquecidas (Li et al. 2021).

Além disso, ensaios foram desenvolvidos usando RPA para detectar *Vibrio parahaemolyticus*, que foi isolado de uma variedade de amostras de frutos do mar contaminados. Por exemplo, Geng et al. (2019) estabeleceram com sucesso um ensaio RPA em tempo real usando um scanner de tubo portátil. A reação RPA em tempo real foi realizada com sucesso a 38 °C e os resultados foram obtidos em 20 min. Para avaliar a sensibilidade do ensaio, o DNA genômico de *V. parahaemolyticus* foi diluído em uma série de 10 para atingir concentrações de DNA variando de 106 a 100 cópias/ μ L. O LoD do ensaio foi de 102 cópias/reação. Para avaliar a especificidade, 5 cepas de *V. parahaemolyticus* e 27 outras cepas de bactérias em alimentos frequentemente contaminados foram amplificadas usando

RPA em tempo real. O ensaio foi específico para a detecção de bactéria *V. parahaemolyticus*, e nenhuma reatividade cruzada foi observado para a cepa de *V. parahaemolyticus* examinada. Jiang et al. (2020) desenvolveram um ensaio RPA com o método de fluxo lateral combinado com separação imunomagnética, que forneceu uma abordagem sensível para o diagnóstico de *V. parahaemolyticus*, com um LoD de 10 pg de DNA genômico. Finalmente, outro grupo desenvolveu um ensaio RPA combinado com o método de fluxo lateral para detecção de *Listeria. monocytogenes* em superfícies de processamento de alimentos. A abordagem alcançou desempenho comparável ao baseado na cultura e ensaios qPCR, e foi capaz de detectar 1,1 pg/μL de DNA alvo puro (Azinheiro et al. 2020).

5. Conclusão

Os numerosos exemplos citados nesta revisão ilustram o interesse atual na RPA como um teste diagnóstico eficaz. O método se destaca por ter o maior crescimento exponencial em termos de aplicações nos últimos anos devido suas inúmeras vantagens que residem em muitos aspectos, incluindo entrega rápida de resultados, alta sensibilidade, especificidade, portabilidade, baixa temperatura operacional e compatibilidade com diversas estratégias de detecção. Como anteriormente discutido, o RPA pode amplificar alvos de DNA e RNA em diferentes tipos de organismos em concentrações abaixo de 10 cópias dentro de 5–30 minutos. Além disso, o RPA pode ser usado com uma ampla variedade de amostras biológicas (soro, plasma, fezes e urina) e diferentes estratégias de detecção são compatíveis com a técnica RPA. Muitos ensaios demonstraram resultados semelhantes ou superiores ao PCR.

No entanto, apesar do uso crescente de RPA e do aumento notável de publicações, existem alguns aspectos importantes limitações ao seu uso. Primeiro, nenhum software está disponível para projetar primers e sondas RPA, o que por sua vez aumenta o risco de duplexes entre pares de primers e sondas, o que pode resultar em combinações inadequadas de primers e levam a falsos positivos, consequentemente diminuindo a sensibilidade do teste. Para resolver este problema, as regras para o projeto do iniciador RPA, incluindo composição de nucleotídeos, comprimento de sequência (tipicamente 32–35 nucleotídeos) e a interação entre os primers diretos e reversos, devem ser cuidadosamente considerados. Em segundo lugar, a sensibilidade do RPA pode ser afetada negativamente pela presença de Carbowax20M, um reagente RPA padrão, resultando em baixos níveis de cópias alvo porque este reagente aumenta a viscosidade da solução e, consequentemente, diminui a taxa de

difusão. No entanto, uma pequena etapa de mistura, entre 8 e 10 inversões de spin-down, pode resolver este problema. Outra desvantagem é a verificação de produtos RPA utilizando eletroforese em gel, que é dificultada pela presença de proteínas de alto peso molecular presentes na reação. Remoção de proteínas RPA após a amplificação é necessária e pode ser alcançada usando colunas de PCR, o que pode aumentar o custo e o tempo do ensaio.

No futuro, deverão ser feitos esforços para minimizar as limitações dos atuais métodos de amplificação isotérmica, como ligação inespecífica e falsos positivos. Além disso, a RPA oferece a oportunidade de integrar plataformas que incluem todos os três processos de detecção molecular (como sistemas microfluídicos). Esta integração é uma abordagem interessante e muito importante para diagnósticos de RPA em ambientes com recursos limitados. Portanto, melhorias devem ser feitas em dispositivos microfluídicos para testes no local de atendimento. Essas melhorias incluem a simplificação do método e o baixo custo de fabricação do material. Finalmente, novas tecnologias de detecção combinadas com RPA devem ser investigados, e estes podem alcançar melhorias no contexto de acessibilidade, multiplexação e compatibilidade com pontos de atendimento.

Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Amazônia), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam), e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio.

Referências

- Abebe, G., Paasch, F., Apers, L., Rigouts, L., and Colebunders, R. 2011. Tuberculosis Drug Resistance Testing by Molecular Methods: Opportunities and Challenges in Resource Limited Settings. *J. Microbiol. Methods*, 84 (2): 155–160. doi:10.1016/j.mimet.2010.11.014. PMID:21129417.
- Ahmed, A., Linden, H.V.D., and Hartskeerl, R.A. 2014. Development of a Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Detection of Pathogenic *Leptospira*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11 (5): 4953–4964. doi:10.3390/ijerph110504953. PMID:24814943.
- Ahmed, A.A., Patel, P., Maier, M., Pietsch, C., Ruster, D., Bohlken-Fascher, S., et al. 2021. Suitcase Lab for Rapid Detection of SARS-CoV-2 Based on Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Anal. Chem.* 93(4): 2627–2634. doi:10.1021/acs.analchem.0c04779. PMID:33471510.
- Alidjinou, E.K., Bock, L., and Hober, D. 2015. Quantification of Viral DNA during HIV-1 Infection: A Review of Relevant Clinical Uses and Laboratory Methods. *Pathol. Biol.* 63 (1): 53–59. doi:10.1016/j.patbio.2014.07.007. PMID:25201144.

- Azinhairo, S., Carvalho, J., Prado, M., and Garrido-Maestu, A. 2020. Application of Recombinase Polymerase Amplification with Lateral Flow for a Naked-Eye Detection of *Listeria Monocytogenes* on Food Processing Surfaces. *Foods*, 9(9): 1249. doi:10.3390/foods9091249.
- Babu, B., Ochoa-Corona, F.M., and Par, M.L. 2018. Recombinase Polymerase Amplification Applied to Plant Virus Detection and Potential Implications. *Anal. Biochem.* 546: 72–77. doi:10.1016/j.ab.2018.01.021. PMID:29408177.
- Bartlett, J.M.S., and Stirling, D. 2003. A Short of the Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol. Biol.* 226(2): 3–6. doi:10.1385/1-59259-384-4:3. PMID:12958470.
- Behrmann, O., Bachmann, I., Spiegel, M., Schramm, M., Abd El Wahed, A., Dobler, G., et al. 2020. Rapid Detection of SARS-CoV-2 by Low Volume Real-Time Single Tube Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Using an Exo Probe with an Internally Linked Quencher (Exo-IQ). *Clin. Chem.* 66 (8): 1047–1054. doi:10.1093/clinchem/hvaa116. PMID:32384153.
- Boyle, D.S., Lehman, D.A., Lillis, L., Peterson, D., Singhal, M., and Armes, N. 2013. Rapid Detection of HIV-1 Proviral DNA for Early Infant Diagnosis Using Recombinase Polymerase Amplification. *mBio*. 24(2): e00135-13. doi:10.1128/ mBio.00135-13. PMID:23549916.
- Boyle, D.S., McNeerney, R., Low, H.T., Leader, B.T., Pérez-Osorio, A.C., Meyer, J.C., et al. 2014. Rapid Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* by Recombinase Polymerase Amplification. *PLoS One*, 9(8): e103091. doi:10.1371/journal.pone.0103091. PMID:25118698.
- Cao, Y., Yan, D., Wu, X., Chen, Z., Lai, Y., Lv, L., et al. 2020. Rapid and Visual Detection of Milk Vetch Dwarf Virus Using Recombinase Polymerase Amplification Combined with Lateral Flow Strips. *Virol. J.* 17: 102. doi:10.1186/s12985-020-01371-5. PMID:32653001.
- Castellanos-Gonzalez, A., White, A.C., Melby, P., and Travi, B. 2018. Molecular Diagnosis of Protozoan Parasites by Recombinase Polymerase Amplification. *Acta Tropica*. 182: 4–11. doi:10.1016/j.actatropica.2018.02.002. PMID:29452112.
- Chandu, D., Paul, S., Parker, M., Dudin, Y., King-Sitjes, J., Perez, T., et al. 2016. Development of a Rapid Point-of-Use DNA Test for the Screening of GenuityVR Roundup Ready 2 YieldVR Soybean in Seed Samples. *BioMed. Res. Int.* 2016: 3145921. doi:10.1155/2016/3145921. PMID:27314015.
- Chiodini, P.L., Bowers, K., Jorgensen, P., Barnwell, J.W., Grady, K.K., Luchavez, J., et al. 2007. The Heat Stability of Plasmodium Lactate Dehydrogenase-Based and HistidineRich Protein 2-Based Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101(4): 331–337. doi:10.1016/j.trstmh.2006.09.007. PMID:17212967.
- Choi, G., Jung, J.H., Park, B.H., Oh, S.J., Seo, J.H., Choi, J.S., et al. 2016. A Centrifugal Direct Recombinase Polymerase Amplification (Direct-RPA) Microdevice for Multiplex and Real-Time Identification of Food Poisoning Bacteria. *Lab Chip*. 16(12): 2309–2316. doi:10.1039/C6LC00329J. PMID:27216297.
- Compton, J. 1991. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Nature*, 350(6313): 91–92. doi:10.1038/350091a0. PMID:1706072.
- Cordray, M.S., and Richards-Kortum, R.R. 2015. A Paper and Plastic Device for the Combined Isothermal Amplification and Lateral Flow Detection of Plasmodium DNA. *Malar. J.* 14(1): 472. doi:10.1186/s12936-015-0995-6. PMID:26611141.
- Corman, V.M., Muller, M.A., Costabel, U., Timm, J., Binger, T., € Meyer, B., et al. 2012. Assays for Laboratory Confirmation of Novel Human Coronavirus (HCoV-EMC) Infections. *Euro. Surveill.* 17(49): 20334. doi:10.2807/ese.17.49.20334-en. PMID: 23231891.

- Crannell, Z.A., Rohrman, B., and Richards-Kortum, R. 2014. Equipment-Free Incubation of Recombinase Polymerase Amplification Reactions Using Body Heat. *PLoS One*, 9(11): e112146. doi:10.1371/journal.pone.0112146. PMID:25372030.
- Cui, J., Zhao, Y., Sun, Y., Yu, L., Liu, Q., Zhan, X., et al. 2018. Detection of *Babesia gibsoni* in Dogs by Combining Recombinase Polymerase Amplification (RPA) with Lateral Flow (LF) Dipstick. *Parasitol. Res.* 117(12): 3945–3951. doi:10.1007/s00436-018-6104-3. PMID:30293152.
- Daher, R.K., Stewart, G., Boissinot, M., and Bergeron, M.G. 2016. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clin. Chem.* 62(7): 947–958. doi:10.1373/clinchem.2015.245829. PMID:27160000.
- Dai, T., Yang, X., Hu, T., Jiao, B., Xu, Y., Zheng, X., and Shen, D. 2019. Comparative Evaluation of a Novel Recombinase Polymerase Amplification-Lateral Flow Dipstick (Rpa-Lfd) Assay, Lamp, Conventional Pcr, and Leaf-Disc Baiting Methods for Detection of *Phytophthora sojae*. *Front Microbiol.* 10: 1884. doi:10.3389/fmicb.2019.01884. PMID:31447827.
- Delwart, E.L. 2007. Viral Metagenomics. *Rev. Med. Virol.* 17(2): 115–131. doi:10.1002/rmv.532. PMID:17295196.
- Deng, H., and Gao, Z. 2015. Bioanalytical Applications of Isothermal Nucleic Acid Amplification Techniques. *Anal. Chim. Acta*, 853(1): 30–45. doi:10.1016/j.aca.2014.09.037. PMID:25467448.
- Dip Gandarilla, A.M., Regiart, M., Bertotti, M., Correa Glória, J., Morais Mariuba, L.A., and Ricardo Brito, W. 2021. One-Step Enzyme-Free Dual Electrochemical Immunosensor for Histidine Rich Protein 2 Determination. *RSC Adv.* 11: 408–415. doi:10.1039/D0RA08729G.
- Dye, C. 2014. After 2015: Infectious Diseases in a New Era of Health and Development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369(1645): 20131426. doi:10.1098/rstb.2013.0426. PMID:24821913
- El Wahed, A.A., Patel, P., Heidenreich, D., Hufert, F.T., and Manfred Weidmann, M. 2013. Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Detection of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *PLOS Curr* 125: 62df1c7c75ffc96cd59034531e2e8364. doi:10.1371/currents.outbreaks.62df1c7c75ffc96cd59034531e2e8364. PMID:24459611.
- Elston, J.W.T., Cartwright, C., Ndumbi, P., and Wright, J. 2017. The Health Impact of the 2014–15 Ebola Outbreak. *Public Health*, 143: 60–70. doi:10.1016/j.puhe.2016.10.020. PMID:28159028.
- Escadafal, C., Faye, O., Sall, A.A., Faye, O., Weidmann, M., Strohmeier, O., et al. 2014. Rapid Molecular Assays for the Detection of Yellow Fever Virus in Low-Resource Settings. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 8 (3): e2730. doi:10.1371/journal.pntd.0002730. PMID:24603874.
- Fang, R., Li, X., Hu, L., You, Q., Li, J., Wu, J., et al. 2009. Cross-Priming Amplification for Rapid Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Sputum Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 47(3): 845–847. doi:10.1128/JCM.01528-08. PMID:19116359.
- Fang, C.S., Kim, K.-S., Ha, D.T., Kim, M.-S., and Yang, H. 2018. Washing-Free Electrochemical Detection of Amplified Double-Stranded DNAs Using a Zinc Finger Protein. *Anal. Chem.* 90(7): 4776–4782. doi:10.1021/acs.analchem.8b00143. PMID:29553715.
- Geng, Y., Tan, K., Liu, L., Sun, X.X., Zhao, B., and Wang, J. 2019. Development and Evaluation of a Rapid and Sensitive RPA Assay for Specific Detection of *Vibrio Parahaemolyticus* in Seafood. *BMC Microbiol.* 19(1): 186. doi:10.1186/s12866-019-1562-z. PMID:31409301.
- Ghosh, D.K., Kokane, S.B., Kokane, A.D., Warghane, A.J., Motghare, M.R., Bhose, S., et al. 2018. Development of a Recombinase Polymerase Based Isothermal Amplification Combined with Lateral Flow Assay (HLB-RPA-LFA) for Rapid Detection of ‘*Candidatus Liberibacter Asiaticus*. *PLoS One*, 13(12): e0208530. doi:10.1371/journal.pone.0208530. PMID:30540789.

- Ghosh, D.K., Kokane, S.B., and Gowda, S. 2020. Development of a Reverse Transcription Recombinase Polymerase Based Isothermal Amplification Coupled with Lateral Flow Immuno chromatographic Assay (CTV-RT-RPA- LFICA) for Rapid Detection of Citrus Tristeza Virus. *Sci Rep*, 10(1): 20593. doi:10.1038/ s41598-020-77692-w. PMID:33244066.
- Gill, P., and Ghaemi, A. 2008. Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies - A Review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 27(3): 224–243. doi:10.1080/15257770701845204. PMID:18260008.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Biotechnology*, 10: 413–417. doi:10.1038/nbt0492-413. PMID:1368485.
- Hou, P., Wang, H., Zhao, G., He, C., and He, H. 2017. Rapid Detection of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Using Recombinase Polymerase Amplification Assays. *BMC Vet. Res.* 13: 386. doi:10.1186/s12917-017-1284-0. PMID:29237466.
- Hu, J., Huang, R., Sun, Y., Wei, X., Wang, Y., Jiang, C., et al. 2019. Sensitive and Rapid Visual Detection of Salmonella Typhimurium in Milk Based on Recombinase Polymerase Amplification with Lateral Flow Dipsticks. *J. Microbiol. Methods*, 158(136): 25–32. doi:10.1016/j.mimet.2019.01.018. PMID:30703446.
- Jiang, W., Ren, Y., Han, J., Xue, J., Shan, T., Chen, Z., et al. 2020. Recombinase Polymerase Amplification-Lateral Flow (RPA-LF) Assay Combined with Immunomagnetic Separation for Rapid Visual Detection of Vibrio Parahaemolyticus in Raw Oysters. *Anal Bioanal Chem.* 412(12): 2903–2914. doi:10.1007/ s00216-020-02532-9. PMID:32128642.
- Jirawannaporn, S., Limothai, U., Tachaboon, S., Dinhuzen, J., Patcharakorn Kiatamornrak, P., Chaisuriyong, W., et al. 2022. Rapid and sensitive point-of-care detection of Leptospira by RPA-CRISPR/Cas12a targeting lipL32. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 16(1): e0010112. doi:10.1371/journal.pntd.0010112. PMID:34990457.
- Johnston, S.P., Pieniazek, N.J., Xayavong, M.V., Slemenda, S.B., Wilkins, P.P., and Silva, A.J. 2006. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. *J. Clin. Microbiol.* 44(3): 1087–1089. doi:10.1128/JCM.44.3.1087-1089.2006. PMID:16517900.
- Kattenberg, J.H., Ochodo, E.A., Boer, K.R., Schallig, H.D., Mens, P.F., and Leeftang, M.M. 2011. Systematic Review and Meta-Analysis: Rapid Diagnostic Tests versus Placental Histology, Microscopy and PCR for Malaria in Pregnant Women. *Malar. J.* 10: 321. doi:10.1186/1475-2875-10-321. PMID:22035448.
- Kersting, S., Rausch, V., Bier, F.F., and Nickisch-Rosenegk, M.V. 2014. Rapid Detection of Plasmodium Falciparum with Isothermal Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Analysis. *Malar. J.* 13(1): 99. doi:10.1186/1475-2875-13-99. PMID:24629133.
- Khaliliazar, S., Ouyang, L., Piper, A., Chondrogiannis, G., Hanze, M., Herland, A., and Hamedi, M.M. 2020. Electrochemical Detection of Genomic DNA Utilizing Recombinase Polymerase Amplification and Stem-Loop Probe. *ACS Omega.* 5(21): 12103–12109. doi:10.1021/acsomega.0c00341. PMID:32548389.
- Khiyami, M.A., Almoammar, H., Awad, Y.M., Alghuthaymi, M.A., and Abd-Elsalam, K.A. 2014. Plant pathogen nanodiagnostic techniques: forthcoming changes? *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 28(5): 775–785. doi:10.1080/13102818.2014.960739. PMID:26740775.
- Kong, M., Li, Z., Wu, J., Hu, J., Sheng, Y., Wu, D., et al. 2019. A Wearable Microfluidic Device for Rapid Detection of HIV-1 DNA Using Recombinase Polymerase Amplification. *Talanta*, 205: 120155. doi:10.1016/j.talanta.2019.120155. PMID:31450450.

- LaBarre, P., Hawkins, K.R., Gerlach, J., Wilmoth, J., Beddoe, A., Singleton, J., et al. 2011. A Simple, Inexpensive Device for Nucleic Acid Amplification without Electricity-toward Instrument-Free Molecular Diagnostics in Low-Resource Settings. *PLoS One*, 6(5): e19738. doi:10.1371/journal.pone.0019738. PMID:21573065.
- Lau, H.Y., Wu, H., Wee, E.J.H., Trau, M., Wang, Y., and Botella, J.R. 2017. Specific and Sensitive Isothermal Electrochemical Biosensor for Plant Pathogen DNA Detection with Colloidal Gold Nanoparticles as Probes. *Sci. Rep.* 7: 38896. doi:10.1038/srep38896. PMID:28094255.
- Lau, Y.L., Ismail, I.B., Mustapa, N.I.B., Lai, M.Y., Tuan Soh, T.S., Haji Hassan, A., et al. 2021. Development of a Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid and Direct Visual Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *PLoS One*, 16(1): e0245164. doi:10.1371/journal.pone.0245164. PMID:33406112.
- Law, J.W.F., Mutalib, N.S.A., Chan, K.G., and Lee, L.H. 2014. Rapid Methods for the Detection of Foodborne Bacterial Pathogens: Principles, Applications, Advantages and Limitations. *Front. Microbiol.* 5: 770. doi:10.3389/fmicb.2014.00770. PMID:25628612.
- Lee, N., Kwon, K.Y., Oh, S.K., Chang, H., Chun, H.S., and Choi, S. 2014. A Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of *Escherichia Coli* O157:H7, *Bacillus Cereus*, *Vibrio Parahaemolyticus*, *Salmonella* Spp., *Listeria Monocytogenes*, and *Staphylococcus Aureus* in Korean Ready-to-Eat Food. *Foodborne Pathog. Dis.* 11(7): 574–580. doi:10.1089/fpd.2013.1638. PMID:24796416.
- Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(2): 296–326. doi:10.1128/CMR.14.2.296-326.2001. PMID:11292640. Li, J., Macdonald, J., and Stetten, F.V. 2018. Review: A Comprehensive Summary of a Decade Development of the Recombinase Polymerase Amplification. *Analyst*, 144(1): 31–67. doi:10.1039/C8AN01621F. PMID:30426974.
- Li, J., Ma, B., Fang, J., Zhi, A., Chen, E., Xu, Y., et al. 2020. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Combined with Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Salmonella in Food. *Foods*, 9(1): 27. doi:10.3390/foods9010027. PMID: 31887998.
- Li, X., Zheng, T., Xie, Y.-N., Li, F., Jiang, X., Hou, X., and Wu, P. 2021. Recombinase Polymerase Amplification Coupled with a Photosensitization Colorimetric Assay for Fast Salmonella Spp. *Anal. Chem.* 93(16): 6559–6566. doi:10.1021/acs.analchem.1c00791. PMID:33852278.
- Lillis, L., Lehman, D., Singhal, M.C., Cantera, J., Singleton, J., Labarre, P., et al. 2014. Non-Instrumented Incubation of a Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Rapid and Sensitive Detection of Proviral HIV-1 DNA. *PLoS One*, 9(9): e108189. doi:10.1371/journal.pone.0108189. PMID:25264766.
- Lillis, L., Lehman, D.A., Siverson, J.B., Weis, J., Cantera, J., Parker, M., et al. 2016. Cross-Subtype Detection of HIV-1 Using Reverse Transcription and Recombinase Polymerase Amplification. *J. Virol. Methods*, 230: 28–35. doi:10.1016/j.jviromet.2016.01.010. PMID:26821087.
- Lim, S.A., and Ahmed, M. 2016. Electrochemical Immunosensors and Their Recent Nanomaterial-Based Signal Amplification Strategies: A Review. *RSC. Advances*, 6: 24995–25014. doi:10.1039/C6RA00333H.
- Liu, W., Liu, H., Zhang, L., Hou, X., Wan, K., and Hao, Q. 2016. A Novel Isothermal Assay of *Borrelia Burgdorferi* by Recombinase Polymerase Amplification with Lateral Flow Detection. *Int. J. Mol. Sci.* 17(8): 1250. doi:10.3390/ijms17081250. PMID:27527151.
- Liu, H.-B., Zang, Y.-X., Du, X.-J., Li, P., and Wang, S. 2017. Development of an Isothermal Amplification-Based Assay for the Rapid Visual Detection of Salmonella Bacteria. *J. Dairy Sci.* 100(9): 7016–7025. doi:10.3168/jds.2017-12566. PMID:28711269.

- Lobato, I.M., and O’Sullivan, C.K. 2018. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends Analyt. Chem.* 98: 19–35. doi:10.1016/j.trac. 2017.10.015. PMID:32287544.
- Londoño, M.A., Harmon, C.L., and Polston, J.E. 2016. Evaluation of Recombinase Polymerase Amplification for Detection of Begomoviruses by Plant Diagnostic Clinics. *Viol. J.* 13(1): 1–9. doi:10.1186/s12985-015-0456-4. PMID:26728778.
- Loo, J.F.C., Lau, P.M., Ho, H.P., and Kong, S.K. 2013. An Aptamer-Based Biol. -Barcode Assay with Isothermal Recombinase Polymerase Amplification for Cytochrome-c Detection and Anti-Cancer Drug Screening. *Talanta*, 115: 159–165. doi:10.1016/j.talanta.2013.04.051. PMID:24054573.
- López, M.M., Llop, P., Olmos, A., Marco-Noales, E., Cambra, M., and Bertolini, E. 2009. Are Molecular Tools Solving the Challenges Posed by Detection of Plant Pathogenic Bacteria and Viruses? *Curr. Issues Mol. Biol.* 11: 13–46. PMID:18577779.
- Lutz, S., Weber, P., Focke, M., Faltin, B., Hoffmann, J., Muller, C., et al. 2010. Microfluidic Lab-on-a-Foil for Nucleic Acid Analysis Based on Isothermal Recombinase Polymerase Amplification (RPA). *Lab Chip.* 10(7): 887–893. doi:10.1039/b921140c. PMID:20300675.
- Ma, L., Zeng, F., Cong, F., Huang, B., Zhu, Y., Wu, M., et al. 2018. Development and Evaluation of a Broadly Reactive Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Murine Norovirus. *BMC Vet Res.* 14(1): 399. doi:10.1186/s12917-018-1736-1. PMID:30547776.
- Ma, L., Shi, H., Zhang, M., Song, Y., Zhang, K., and Cong, F. 2020. Establishment of a Real-Time Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Detection of Avian Reovirus. *Front. Vet. Sci.* 7: 551350. doi:10.3389/fvets.2020.551350. PMID: 33195523.
- Magro, L., Jacquelin, B., Escadafal, C., Garneret, P., Kwasiborski, A., Manuguerra, J.-C., et al. 2017. Paper-Based RNA Detection and Multiplexed Analysis for Ebola Virus Diagnostics. *Sci. Rep.* 7(1): 1347. doi:10.1038/s41598-017-00758-9. PMID:28465576.
- Mayboroda, O., Gonzalez Benito, A., Sabaté del Rio, J., Svobodova, M., Julich, S., Tomaso, H., et al. 2016. Isothermal Solid-Phase Amplification System for Detection of *Yersinia Pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 408(3): 671–676. doi:10.1007/s00216-015-9177-1. PMID:26563112.
- McNerney, R., and Daley, P. 2011. Towards a Point-of-Care Test for Active Tuberculosis: Obstacles and Opportunities. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(3): 204–213. doi:10.1038/nrmicro2521. PMID:21326275.
- Mekuria, T.A., Zhang, S., and Eastwell, K.C. 2014. Rapid and Sensitive Detection of Little Cherry Virus 2 Using Isothermal Reverse Transcription-Recombinase Polymerase Amplification. *J. Virol. Methods*, 205: 24–30. doi:10.1016/j.jviromet.2014. 04.015. PMID:24797461.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51: 263–273. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032. PMID:3472723.
- Ng, B.Y.C., Wee, E.J.H., West, N.P., and Trau, M. 2015. Rapid DNA Detection of *Mycobacterium Tuberculosis*-towards Single Cell Sensitivity in Point-of-Care Diagnosis. *Sci. Rep.* 5(1): 1–7. doi:10.1038/srep15027.
- Noh, J.Y., Yoon, S.-W., Kim, D.-J., Lee, M.-S., Kim, J.-H., Na, W., et al. 2018. Correction to: Simultaneous Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome, Middle East Respiratory Syndrome, and Related Bat Coronaviruses by RealTime Reverse Transcription PCR. *Arch. Virol.* 163(3): 819. doi:10.1007/s00705-017-3677-6. PMID:29273879.

- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., et al. 2000. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12): e63. doi:10.1093/nar/28.12.e63. PMID:10871386.
- Pai, N.P., Vadnais, C., Denking, C., Engel, N., and Pai, M. 2012. Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: Diversity, Complexity, and Barriers in Low- And Middle-Income Countries. *PLOS Med.* 9(9): e1001306. doi:10.1371/journal.pmed.1001306. PMID:22973183.
- Piepenburg, O., Williams, C.H., Stemple, D.L., and Armes, N.A. 2006. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLOS Biol.* 4(7): e204. doi:10.1371/journal.pbio.0040204. PMID:16756388.
- Piorkowski, G., Baronti, C., de Lamballerie, X., de Fabritus, L., Bichaud, L., Pastorino, B.A., et al. 2014. Development of Generic Taqman PCR and RT-PCR Assays for the Detection of DNA and MRNA of b-Actin-Encoding Sequences in a Wide Range of Animal Species. *J. Virol. Methods*, 202: 101–105. doi:10.1016/j.jviromet.2014.02.026. PMID:24642236.
- Rohrman, B.A., and Richards-Kortum, R.R. 2012. A Paper and Plastic Device for Performing Recombinase Polymerase Amplification of HIV DNA. *Lab Chip.* 12(17): 3082–3088. doi:10.1039/c2lc40423k. PMID:22733333.
- Rosser, A., Rollinson, D., Forrest, M., and Webster, B.L. 2015. Isothermal Recombinase Polymerase Amplification (RPA) of *Schistosoma Haematobium* DNA and Oligochromatographic Lateral Flow Detection. *Parasit Vectors*, 8: 446. doi:10.1186/s13071-015-1055-3. PMID:26338510.
- Rostron, P., Pennance, T., Bakar, F., Rollinson, D., Knopp, S., Allan, F., et al. 2019. Development of a Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Fluorescence Assay for the Detection of *Schistosoma Haematobium*. *Parasit Vectors*, 12(1):514. doi:10.1186/s13071-019-3755-6. PMID:31685024.
- Sánchez-Salcedo, R., Miranda-Castro, R., Santos-Álvarez, N., and Lobo-Castañón, M.J. 2019. On-Gold Recombinase Polymerase Primer Elongation for Electrochemical Detection of Bacterial Genome: Mechanism Insights and Influencing Factors. *ChemElectroChem.* 6: 793–800. doi:10.1002/celec.201801208.
- Santiago-Felipe, S., Tortajada-Genaro, F.L.A., Morais, S., Puchades, R., and Maquieí, A. 2014. One-Pot Isothermal DNA Amplification - Hybridisation and Detection by a Disc-Based Method. *Sens. Actuators B Chem.* 204: 273–281. doi:10.1016/j.snb.2014.07.073.
- Silva, G., Oyekanmi, J., Nkere, C.K., Bömer, M., Kumar, P.L., and Seal, S.E. 2018. Rapid Detection of Potyviruses from Crude Plant Extracts. *Anal. Biochem.* 546: 17–22. doi:10.1016/j.ab.2018.01.019. PMID:29378167.
- Singpanomchai, N., Akeda, Y., Tomono, K., Tamaru, A., Santanirand, P., and Ratthawongjirakul, P. 2019. Naked Eye Detection of the *Mycobacterium Tuberculosis* Complex by Recombinase Polymerase Amplification—SYBR Green I Assays. *J. Clin. Lab. Anal.* 33(2): e22655. doi:10.1002/jcla.22655. PMID:30129085.
- Taylor, M.P., Kobilier, O., and Enquist, L.W. 2012. Alphaherpesvirus Axon-to-Cell Spread Involves Limited Virion Transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(42): 17046–17051. doi:10.1073/pnas.1212926109. PMID:23027939.
- Teoh, B.-T., Sam, S.-S., Tan, K.-K., Danlami, M.B., Shu, M.-H., Johari, J.J., et al. 2015. Early Detection of Dengue Virus by Use of Reverse Transcription-Recombinase Polymerase Amplification. *J. Clin. Microbiol.* 53(3): 830–837. doi:10.1128/JCM.02648-14. PMID:25568438.
- Theel, E.S., and Pritt, B.S. 2016. Parasites. *Microbiol. Spectr.* 4(4). doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0013-2015. PMID:27726821.

Tsaloglou, M.-N., Watson, R.J., Rushworth, C.M., Zhao, Y., Niu, X., Sutton, J.M., and Morgan, H. 2015. Real-Time Microfluidic Recombinase Polymerase Amplification for the Toxin B Gene of *Clostridium Difficile* on a SlipChip Platform. *Analyst*, 140(1): 258–264. doi:10.1039/C4AN01683A. PMID:25371968.

TwistDx. 2018. Combined Instruction Manual. Available from twistdx.co.uk.

Vasileva Wand, N.I., Bonney, L.C., Watson, R.J., Graham, V., and Hewson, R. 2018. Point-of-Care Diagnostic Assay for the Detection of Zika Virus Using the Recombinase Polymerase Amplification Method. *J. Gen. Virol.* 99(8): 1012– 1026. doi:10.1099/jgv.0.001083. PMID:29897329.

Vincent, M., Xu, Y., and Kong, H. 2004. Helicase-Dependent Isothermal DNA Amplification. *EMBO Rep.* 5(8): 795–800. doi:10.1038/sj.embor.7400200. PMID:15247927.

Wahed, A.A., Patel, P., Maier, M., Pietsch, C., Ruster, D., Böhlken-Fascher, S., et al. 2021. Suitcase Lab for Rapid Detection of SARS-CoV-2 Based on Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Anal. Chem.* 93(4): 2627–2634. doi:10.1021/acs. analchem.0c04779. PMID:33471510.

Walker, G.T., Little, M.C., Nadeau, J.G., and Shank, D.D. 1992a. Isothermal in Vitro Amplification of DNA by a Restriction Enzyme/DNA Polymerase System. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(1): 392–396. doi:10.1073/pnas.89.1.392. PMID:1309614.

Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G., and Malinowski, D.P. 1992b. Strand Displacement Amplification — an Isothermal, in Vitro DNA Amplification Technique. *Nucleic Acids Res.* 20(7): 1691–1696. doi:10.1093/nar/20.7.1691. PMID:1579461.

Wang, J., Liu, L., Li, R., Wang, J., Fu, Q., and Yuan, W. 2016a. Rapid and Sensitive Detection of Canine Parvovirus Type 2 by Recombinase Polymerase Amplification. *Arch. Virol.* 161(4): 1015–1018. doi:10.1007/s00705-015-2738-y. PMID:26729477.

Wang, J., Wang, J., Liu, L., Li, R., and Yuan, W. 2016b. Rapid Detection of Porcine Circovirus 2 by Recombinase Polymerase Amplification. *J. Vet. Diagn. Invest.* 28(5): 574–578. doi:10.1177/1040638716654201. PMID:27493138.

Wang, J., Liu, L., Wang, J., Sun, X., and Yuan, W. 2017. Recombinase Polymerase Amplification Assay-a Simple, Fast and Cost-Effective Alternative to Real Time PCR for Specific Detection of Feline Herpesvirus-1. *PLoS One*, 12: e0166903. doi:10.1371/journal.pone.0166903. PMID:28045956.

Wang, Z.H., Wang, X.J., and Hou, S.H. 2019. Development of a Recombinase Polymerase Amplification Assay with Lateral Flow Dipstick for Rapid Detection of Feline Parvovirus. *J. Virol. Methods*, 271: 113679. doi:10.1016/j.jviromet.2019.113679. PMID:31216435.

Wang, J., Li, R., Sun, X., Liu, L., and Hao, X. 2020. Development and Validation of the Isothermal Recombinase Polymerase Amplification Assays for Rapid Detection of *Mycoplasma Ovipneumoniae* in Sheep. *BMC Vet. Res.* 16(1): 172. doi:10.1186/s12917-020-02387-3. PMID:32487081.

Wee, E.J.H., Ngo, T.H., and Trau, M. 2015. A Simple Bridging Flocculation Assay for Rapid, Sensitive and Stringent Detection of Gene Specific DNA Methylation. *Sci. Rep.* 5(1): 15028. doi:10.1038/srep15028. PMID:26458746.

Weidmann, M., Faye, O., Faye, O., Kranaster, R., Marx, A., Nunes, M.R.T., et al. 2010. Improved LNA Probe-Based Assay for the Detection of African and South American Yellow Fever Virus Strains. *J. Clin. Virol.* 48(3): 187–192. doi:10.1016/j.jcv.2010.04.013. PMID:20556888.

Wekesa, E. 2019. HIV Testing Experiences in Nairobi Slums: The Good, the Bad and the Ugly. *BMC Public Health*, 19(1): 1600. doi:10.1186/s12889-019-7975-7. PMID:31783749.

- Xia, X., Yu, Y., Weidmann, M., Pan, Y., Yan, S., and and, W.Y. 2014. Rapid Detection of Shrimp White Spot Syndrome Virus by Real Time, Isothermal Recombinase Polymerase Amplification Assay. *PLoS One*, 9(8): e104667. doi:10.1371/ journal.pone.0104667. PMID:25121957.
- Xing, W., Yu, X., Feng, J., Sun, K., Fu, W., Wang, Y., et al. 2017. Field Evaluation of a Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Diagnosis of *Schistosoma Japonicum* Infection in Hunan Province of China. *BMC Infect. Dis.* 17(1): 164. doi:10.1186/s12879-017-2182-6. PMID:28222680.
- Xu, C., Li, L., Jin, W., and Wan, Y. 2014. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) of CaMV-35S Promoter and Nos Terminator for Rapid Detection of Genetically Modified Crops. *Int. J. Mol. Sci.* 15(10): 18197–18205. doi:10.3390/ ijms151018197. PMID:25310647.
- Xu, Y., Wu, P., Zhang, H., and Li, J. 2021. Rapid Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Based on Antigen 85B via Real-Time Recombinase Polymerase Amplification. *Lett. Appl. Microbiol.* 72(2): 106–112. doi:10.1111/lam.13364. PMID:32726877.
- Yang, S., and Rothman, R.E. 2004. PCR-Based Diagnostics for Infectious Diseases: Uses, Limitations, and Future Applications in Acute-Care Settings. *Lancet Infect. Dis.* 4(6): 337–348. doi:10.1016/S1473-3099(04)01044-8. PMID:15172342.
- Yang, M., Ke, Y., Wang, X., Ren, H., Liu, W., Lu, H., et al. 2016. Development and Evaluation of a Rapid and Sensitive EBOV-RPA Test for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Disease. *Sci. Rep.* 6(1): 26943. doi:10.1038/srep26943. PMID:27246147.
- Yang, B., Kong, J., and Fang, X. 2019. Bandage-like Wearable Flexible Microfluidic Recombinase Polymerase Amplification Sensor for the Rapid Visual Detection of Nucleic Acids. *Talanta*, 204: 685–692. doi:10.1016/j.talanta.2019.06.031. PMID: 31357353.
- Yu, X., Jiang, W., Shi, Y., Ye, H., and Lin, J. 2019. Applications of Sequencing Technology in Clinical Microbial Infection. *J. Cell Mol. Med.* 23(11): 7143–7150. doi:10.1111/jcmm.14624. PMID:31475453.
- Zhang, S., Ravelonandro, M., Russell, P., McOwen, N., Briard, P., Bohannon, S., and Vrient, A. 2014. Rapid Diagnostic Detection of Plum Pox Virus in *Prunus* Plants by Isothermal AmplifyRPVR Using Reverse Transcription-Recombinase Polymerase Amplification. *J. Virol. Methods*, 207: 114–120. doi:10.1016/j.jviromet. 2014.06.026. PMID:25010790.
- Zhang, Y., Tian, J., Li, K., Tian, H., and Xu, W. 2019. Label Free Visual Biosensor Based on Cascade Amplification for the Detection of *Salmonella*. *Analytica Chimica Acta.* 1075: 144–151. doi:10.1016/j.aca.2019.05.020. PMID:31196420.
- Zhao, C., Sun, F., Li, X., Lan, Y., Du, L., Zhou, T., and Zhou, Y. 2019. Reverse Transcription-Recombinase Polymerase Amplification Combined with Lateral Flow Strip for Detection of Rice Black-Streaked Dwarf Virus in Plants. *J. Virol. Methods*, 263: 96–100. doi:10.1016/j.jviromet.2018.11.001. PMID:30395887.
- Zhao, L., Wang, J., Sun, X.X., Wang, J., Chen, Z., Xu, X., et al. 2021. Development and Evaluation of the Rapid and Sensitive RPA Assays for Specific Detection of *Salmonella* Spp. in Food Samples. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11: 631921. doi:10.3389/fcimb.2021.631921. PMID:33718280.

CAPÍTULO 2

5. CAPÍTULO 2: ARTIGO ORIGINAL

Neste capítulo é apresentado o objetivo específico 2 deste trabalho, o qual foi detectar *Plasmodium vivax* em amostras clínicas através do ensaio baseado no sistema CRISPR/Cas13a por fluorescência. O ensaio foi desenvolvido para oferecer uma alternativa de diagnóstico sensível e específica para malária causada por *P. vivax*, utilizando um par de iniciadores específicos para uma região do gene *pvmdr-1*, uma sequência de crRNA que se anela a região alvo e a proteína LwCas13a, a qual possui alta especificidade relatada em literatura. Durante o estudo, foram analisadas um total de 50 amostras clínicas, incluindo 27 amostras positivas, 19 negativas, 1 falso-positiva e 3 falso-negativas. Os resultados mostraram sensibilidade satisfatória do ensaio, com a capacidade de detectar a presença de *P. vivax* mesmo em baixas concentrações, com limite de detecção tão baixo quanto 1,35 pM. Neste estudo, o ensaio de detecção baseado no sistema CRISPR/Cas13a mostrou potencial como uma ferramenta promissora para o diagnóstico da malária causada por *P. vivax*.

Informações sobre o artigo original:

Título: Avaliação de teste de detecção baseado em CRISPR/Cas13 para *Plasmodium vivax* em amostras clínicas

Situação:

Em revisão para publicação.

Revista sugerida:

Plos One

AVALIAÇÃO DE ENSAIO DE DETECÇÃO BASEADO EM CRISPR/Cas13 PARA *Plasmodium vivax* EM AMOSTRAS CLÍNICAS

D. S. Mota^{1,2}, A. M. D. Gandarilla^{3,4}, W. R. Brito^{3,4} L. A. M. Mariúba^{1,2,5}

- 1- Laboratório de diagnóstico e controle de doenças infecciosas na Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane – Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz (ILMD-FIOCRUZ), Manaus, AM, 69057-070, Brasil;
- 2- Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-005, Brasil;
- 3- Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-005, Brasil;
- 4- Laboratório de Bioeletroquímica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-005, Brasil;
- 5- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;

Autor correspondente: Luis André Morais Mariúba
Email: andre.mariuba@fiocruz.br

Resumo: A malária é uma doença parasitária considerada um problema de saúde pública. Esta doença é predominantemente encontrada em áreas tropicais e subtropicais do mundo. A malária pode ser prevenida e tratada utilizando diferentes estratégias, conforme recomendado pela OMS. Métodos de diagnósticos rápidos, sensíveis e portáteis são essenciais para o tratamento adequado e controle eficiente da malária. Repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente inter espaçadas (CRISPR) e proteínas associadas (Cas) estão sendo cada vez mais usados para aplicações de diagnóstico clínico, devido à sua alta sensibilidade, seletividade e flexibilidade. Neste estudo, foi realizado um ensaio para detecção de *Plasmodium vivax* em amostras clínicas através do sistema CRISPR/Cas13a por fluorescência. Durante o estudo, foram analisadas um total de 50 amostras clínicas, incluindo 27 amostras positivas, 19 negativas, 1 falso-positiva e 3 falso-negativas. Os resultados mostraram sensibilidade satisfatória do ensaio, com a capacidade de detectar a presença de *P. vivax* mesmo em baixas concentrações, com limite de detecção tão baixo quanto 1,35 pM. Portanto, o ensaio CRISPR/Cas13a pode ser uma alternativa

viável aos testes convencionais para auxiliar no diagnóstico de malária em ambientes clínicos com baixos recursos.

Palavras-chave: malária; *P. vivax*; CRISPR/Cas13a; PCR; diagnóstico

1. INTRODUÇÃO

A malária é considerada um problema de saúde pública global em humanos ao longo de anos, devido a ser uma das principais doenças com maior impacto na morbidade e mortalidade em muitos países tropicais e subtropicais (OMS, 2021). Segundo o relatório mundial de malária de 2022, mostrou que os casos da doença aumentaram de 245 milhões em 2020 para 247 milhões em 2021 (OMS, 2022). O aumento de casos de malária pode ser justificado pelo declínio na eficácia das ferramentas primárias de detecção, ausência de vacina eficaz, surgimento e disseminação da resistência a medicamentos antimaláricos em parasitas e resistência em populações de *Anopheles* a redes inseticidas (Britton et al., 2016; Feachem et al. 2010).

Os agentes causadores da malária são parasitas pertencentes ao gênero *Plasmodium*. As espécies de *Plasmodium* que naturalmente infectam humanos e causam malária são limitadas a seis, sendo as infecções mais prevalentes por *P. falciparum* e *P. vivax* (OMS, 2019). No Brasil, a transmissão da malária predomina na região amazônica abrangendo cerca de 99% dos casos no país. Em 2020, foram registrados 145.188 casos no Brasil, com total de 118.651 casos notificados causados pela espécie *P. vivax* (Ministério da Saúde, 2021). Embora as infecções por *P. vivax* sejam consideradas benignas, nos últimos anos tem se observado um padrão incomum de complicações clínicas associadas a infecção por essa espécie. Tais manifestações graves foram relatadas em estudos recentes em diferentes lugares do mundo, como malária cerebral, síndrome respiratória aguda, lesão pulmonar, insuficiência renal, disfunção hepática, icterícia e anemia grave, dentre outras, podendo levar a morte desses pacientes (da Veiga et al. 2023; Rahimi et al., 2014).

O diagnóstico preciso e específico é indispensável para o controle e eliminação da malária, especificamente em ambientes com recursos limitados. Atualmente, os métodos de diagnósticos tradicionais baseiam-se na microscopia e nos testes de diagnóstico rápido (RDT). Apesar do curto tempo de resposta, esses métodos possuem grandes limitações. A microscopia e os RDTs são menos sensíveis e incapazes de detectar baixa parasitemia de infecções (McMorrow et al., 2011). Para superar essas limitações, métodos moleculares

como a reação em cadeia da polimerase (PCR) apresentam resultados altamente sensíveis e específicos para identificação de diferentes espécies de *Plasmodium*, embora a necessidade de equipamento e o tempo prolongado possa dificultar sua aplicação em ambientes com poucos recursos (Zheng et al. 2017; Tiono et al. 2014).

A tecnologia de Sistemas de Repetições Palindrômicas curtas agrupadas regularmente inter espaçadas (CRISPR) e proteínas associadas (Cas) tem sido cada vez mais empregados em aplicações de diagnóstico clínico, devido a oferecer vantagens como alta sensibilidade, especificidade e flexibilidade (Yan et al., 2019). Os métodos baseados em CRISPR/Cas podem detectar eficientemente patógenos em amostras humanas, convertendo sequências alvo de ácidos nucleicos em sinais fluorescentes. Por exemplo, o sistema CRISPR/Cas13a, uma tecnologia direcionada a RNA e guiada por RNA, tem sido uma plataforma promissora de diagnóstico molecular. Ao combinar a clivagem colateral da proteína Cas13a com amplificação molecular, Gootenberg et al. estabeleceram uma plataforma baseada em CRISPR para detectar ácidos nucleicos específicos do vírus Zika em escala attomolar e especificidade de base única (Gootenberg et al., 2017; Kellner et al., 2019).

Portanto, o objetivo deste estudo foi detectar *Plasmodium vivax* em amostras clínicas através do ensaio baseado no sistema CRISPR/Cas13a por fluorescência. O desempenho do ensaio proposto foi avaliado utilizando amostras de DNA de pacientes infectados por *P. vivax*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Declaração ética

As 50 amostras de soro utilizadas neste estudo fazem parte do projeto “Avaliação de métodos para diagnóstico de malária”, aprovado pelo comitê de ética sob número CAAE 28823719.4.1001.0005. Os pacientes foram atendidos, assinaram formulário de consentimento informado e as coletas das amostras foram realizadas na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (CEP/FMT-HVD), localizado na cidade de Manaus, Amazonas (Anexo 1).

2.2 Desenvolvimento do ensaio CRISPR/Cas13a

Foi desenvolvido um ensaio de detecção baseado no sistema CRISPR/Cas13a para malária, e as etapas deste método são apresentadas na figura 1.

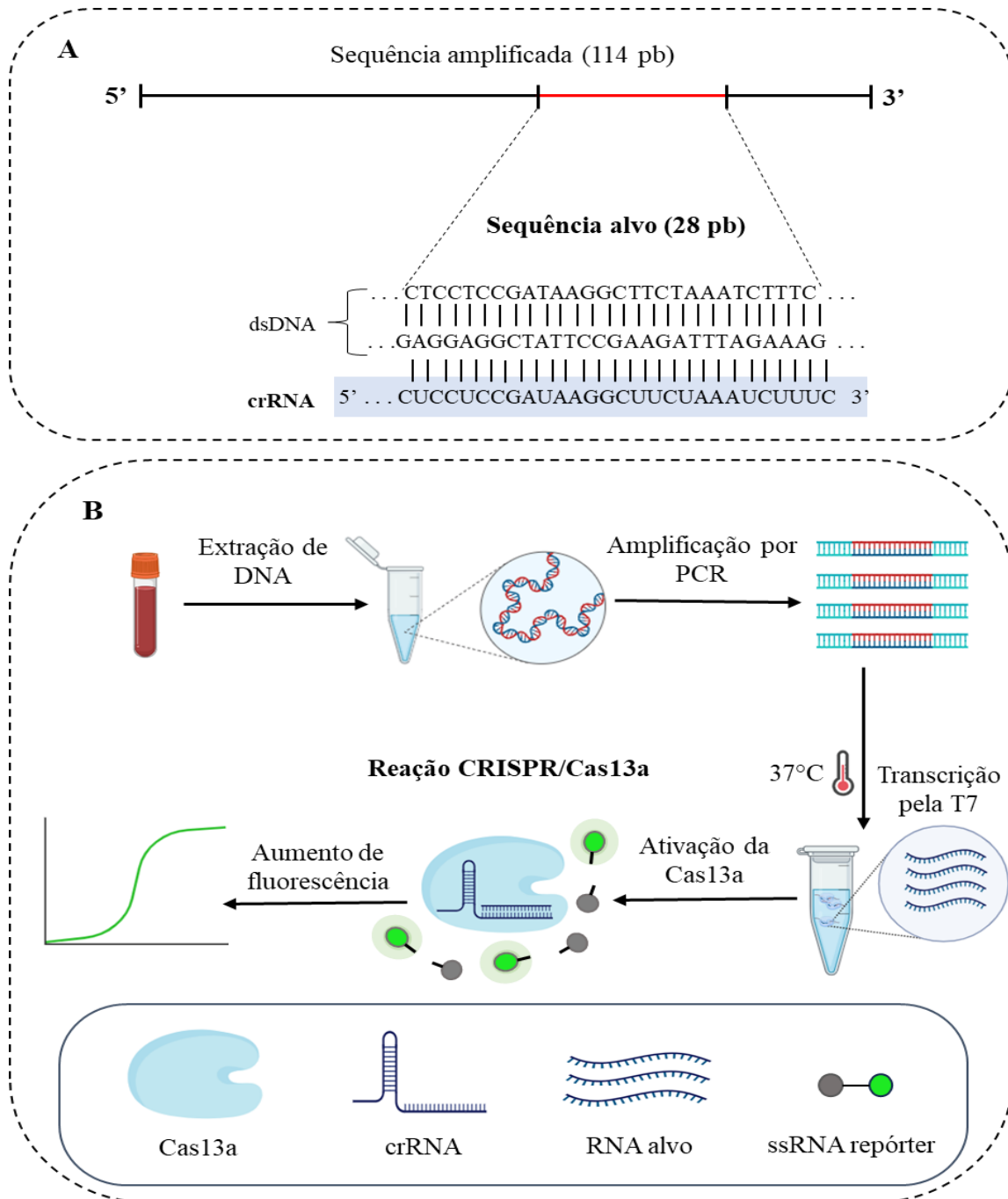


Figura 1: Fluxo de trabalho de detecção de *P. vivax* baseado em CRISPR/Cas13a. **A:** A sequência do crRNA foi projetada com base em uma região específica do gene alvo (*pvmdr-1*). **B:** O DNA de *P. vivax* é extraído de amostras clínicas, que é então usado para amplificação por PCR, durante a qual a sequência do promotor T7 foi ligada às extremidades 5' dos produtos de PCR. Em seguida, os produtos de PCR foram submetidos a reação CRISPR/Cas13a, onde foram transcritos em RNA pela T7 e a clivagem colateral de Cas13a foi ativada após o crRNA se ligar de forma específica a sequência do RNA alvo. O aumento do sinal fluorescente produzido pela clivagem de RNAs repórter indicou a presença de *P. vivax* em amostras clínicas.

2.3 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico de *P. vivax* foi realizada através do kit ChargeSwitch gDNA Blood (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies) e analisadas em eletroforese em gel de agarose. Após a análise da integridade, as amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento da utilização.

2.4 Preparação da proteína Cas13a

A proteína Cas13a utilizada neste estudo, LwCas13a, foi expressa e purificada de acordo com as instruções fornecidas pelo Protocolo SHERLOCK (Kellner et al., 2019). A proteína LwCas13a foi quantificada de acordo com as instruções fornecidas com o Bradford Protein Assay Kit. Alíquotas da proteína LwCas13a purificada foram armazenadas a -80°C.

2.5 Amplificação por PCR

Os iniciadores para PCR foram concebidos com base na região do gene *pvm-dr-1* (transportador de multirresistente-1 de *P. vivax*). As sequências são apresentadas na tabela 1. Os oligonucleotídeos foram desenhados com base nas sequências depositadas no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e projetadas utilizando o programa Primer-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Foi adicionado uma sequência promotora de T7 à extremidade 5' do iniciador *forward* para permitir a transcrição *in vitro* pela polimerase T7 durante a etapa de detecção de CRISPR/Cas13a.

Tabela 1: Par de iniciadores empregados para amplificar o gene alvo nas técnicas moleculares

Oligonucleotídeos	Sequência 5'→ 3'	Nº
<i>pvm-dr-1</i>	Forward: <u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGGTTAGCAAC</u> TCCATAAAGAACAACATCAA	53
	Reverse: CTGTTGGAATCACTTTGAGAAGAAAAAC	28

Sublinhado: sequência referente a região promotora T7

A amplificação por PCR foi realizada usando um kit de amplificação Taq Polimerase (Cellco) em um volume de reação total de 12,5 µL, que consistiu em 1X buffer, 1,5 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 2,0 µmol L⁻¹ de dNTP, 1,0 pmol de cada iniciador, 0,76 U Taq DNA

Polimerase (Cellco), 1 µL de DNA e H₂O Milli-Q (ajustado para o volume final). As condições utilizadas na reação de PCR consistiram em desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos passando pelas etapas de desnaturação a 95 °C por 40 seg, anelamento dos iniciadores com as fitas moldes na temperatura de 58 °C por 40 seg, extensão das novas fitas a 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Após a amplificação, os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizado e documentado pelo sistema iBright FL1000 (Invitrogen). Após a análise, os produtos de amplificação foram armazenados à -20 °C para os ensaios subsequentes de detecção por fluorescência.

2.6 Preparação e purificação do crRNA

O crRNA foi desenhado de acordo com as características da proteína LwCas13a. As sequências são mostradas na tabela 2. Primeiramente, os oligonucleotídeos para a síntese de crRNA foram projetados como dois oligonucleotídeos de DNA de cadeia simples (ssDNA) complementares e depois transcritos *in vitro* para produzir crRNAs de fitas simples. Cada oligonucleotídeo de ssDNA é composto de três partes: uma região espaçadora variável (para facilitar o reconhecimento da molécula alvo de RNA), uma região conservadora (para facilitar a associação de crRNA com a proteína Cas13a) e uma sequência promotora T7 (para facilitar a transcrição *in vitro* de crRNA).

Tabela 2: Sequências do oligonucleotídeos para construção do crRNA

Oligonucleotídeos	Sequência 5'→ 3'	Nº
Par de oligonucleotídeo ssDNA	Fita 1: <u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGGG</u> GATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAACCTCCTCCGATAAGGCTTCTAAATCTTTC	89
	Fita 2: <u>GAAAGATTTAGAAAGCCTTATCGGAGGAGGTTT</u> TAGTCCCCTTCGTTTTTGGGGTAGTCTAAATCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	89
crRNA após a T7 Polimerase	Fita crRNA: GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACCUCCCUCCGAUAAGGUUCUAAAUCUUUC	64

Sublinhado: sequência referente a região promotora T7; Negrito: Sequência variável referente ao gene alvo

Posteriormente, os oligonucleotídeos ssDNA complementares foram emparelhados (concentração final de 10 μmol cada) por 5 minutos a 95°C para formar DNA de cadeia dupla (dsDNA). Os modelos de dsDNA formados foram transcritos *in vitro* usando T7 RNA Polymerase Kit (Cellco), de acordo com as instruções do fabricante. Após incubação a 37°C por 12 horas, os crRNAs foram purificados usando esferas magnéticas RNAClean XP (Beckman Coulter) de acordo com as instruções do fabricante, em seguida, quantificados por espectrofotometria NanoDrop ND1000 e armazenados em freezer -80 °C ou até sua utilização.

2.7 Ensaio de detecção CRISPR/Cas13a

Para os ensaios de detecção de CRISPR/Cas13a por fluorescência foram realizados usando 20 μL de volume total, o qual continha um tampão com 63,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Cas13a purificada, 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ de crRNA, 1 mol L^{-1} de HEPES pH = 6,8, 1 mol L^{-1} de MgCl_2 , 25 mmol L^{-1} rNTP, 40U de inibidor de RNase, 5U de T7 RNA Polimerase, 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de RNA Alert v2 e água livre de RNase. Foi adicionado 1 μL da amostra de reação amplificada de PCR ao mix. O monitoramento do sinal de fluorescência foi medido a cada 5 minutos por até 3 horas em um leitor de placa fluorescente StepOne®, e os dados de detecção foram coletados e analisados pelo *software* StepOne® versão 2.1, ambos da Applied Biosystems.

2.8 Sensibilidade analítica

Para determinar a sensibilidade analítica dos ensaios CRISPR/Cas13a, a concentração inicial do DNA genômico de *P. vivax* foi de 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ em 8 séries de diluição (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ a 0.001 $\text{ag}/\mu\text{L}$). Como controle negativo, no sistema de reação foi adicionado 1 μL de água livre de DNase/RNase em vez de produtos de PCR.

3. RESULTADOS

3.1 Desenvolvimento do ensaio CRISPR/Cas13a

Para os ensaios CRISPR, a proteína LwCas13a foi expressa e posteriormente purificada por cromatografia de afinidade em coluna de estreptavidina e cromatografia por filtração em gel. Após as etapas de purificação, foi possível observar em gel de SDS-PAGE

nitidamente a banda da proteína de interesse com rendimento de aproximadamente de 3,08 mg/mL, embora tenha apresentado ainda algumas bandas de tamanho inferior que presumimos serem contaminantes ou clivagem da proteína resultante das etapas de purificação. No entanto, pode-se considerar que a purificação de proteína foi satisfatória, uma vez que foram obtidos bons rendimentos e pouca contaminação (Figura 2.A).

Para obtenção da amplificação do alvo, selecionamos uma sequência do gene *pvmdr-1* específica para *P. vivax* como sequência alvo para o crRNA. Testou-se uma concentração 50 ng/μL de DNA genômico extraído de amostras clínicas. Os produtos de amplificação da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2%, resultando na reação positiva uma banda específica de 114 pares de bases, e está encontra-se íntegra, sem arrastes ou contaminações (Figura 2.B). Além disso, observar-se que os iniciadores para *pvmdr-1* têm um bom efeito de amplificação, e nenhuma banda de amplificação pode ser observada em reações com controles negativos. Assim, este par de iniciadores foi utilizado para experimentos de detecção subsequente.

A fim de avaliar o crRNA projetado e a atividade específica de Cas13a, o produto amplificado por PCR foi adicionado a reação CRISPR/Cas13a. Os resultados revelaram que o crRNA direcionado ao fragmento do gene *pvmdr-1* exibiu reconhecimento específico direcionado a sequência alvo devido a ativação de RNase da Cas13a. Para averiguar a clivagem colateral (inespecífica), foram adicionados à reação RNAs repórteres marcados com fluoróforos. A Cas13a degradou eficientemente as moléculas repórteres de RNA, conforme observado pelo aumento do sinal de fluorescência, que foi gerado em níveis crescentes apenas na presença de alvo, indicando a atividade de clivagem colateral ativa da proteína.

Como pode ser observado na figura 2.C, nos primeiros 10 minutos de reação é possível observar um aumento na curva de fluorescência baseada em CRISPR/Cas13a com material genético de *P. vivax* (curva azul), alcançando o valor máximo aos 40 minutos. Após esse tempo, a intensidade permaneceu praticamente a mesma, não sendo observado mudanças nos níveis de fluorescência. Assim, pode-se observar uma economia de tempo necessário para obtenção do resultado, visto a rapidez do aparecimento de fluorescência no sistema. Além disso, nenhum resultado falso positivo foi encontrado nos controles negativos (curvas verde e vermelha), apresentando um sinal de fluorescência significativamente menor em comparação com o controle positivo.

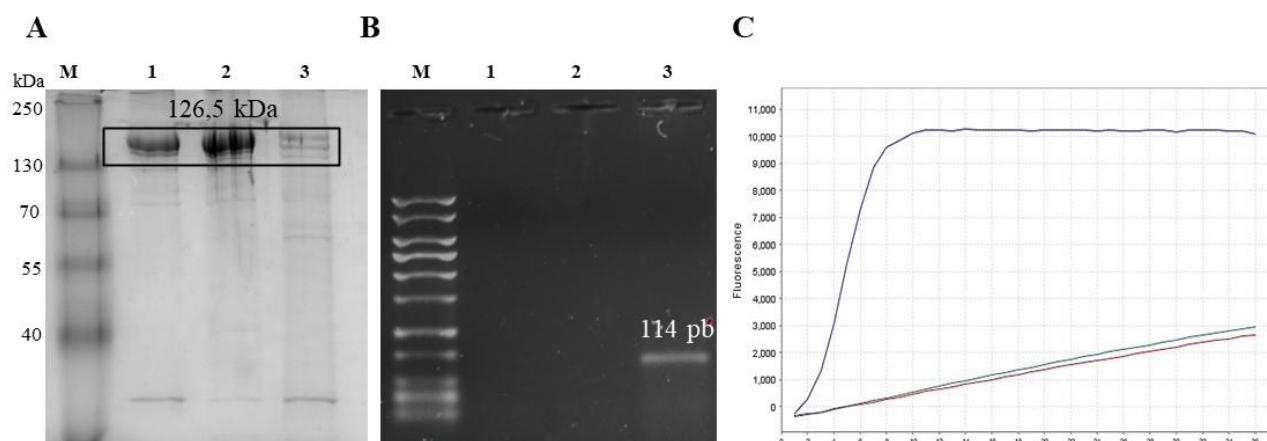


Figura 2: Desenvolvimento do ensaio CRISPR/Cas13a. **A:** Análise por SDS-PAGE 12% da purificação da proteína Cas13a por cromatografia gel filtração. M – Marcador PageRuler™Ladder (Thermo Scientific); canaletas 1-3 – frações contendo a LwCas13a. **B:** Análise por eletroforese em gel de agarose 2% do produto de amplificação por PCR. M: Marcador 1kb DNA Ladder (Cellco); 1: Controle negativo constituído por água ultrapura estéril em substituição à amostra de DNA; 2: Controle negativo com amostra de DNA de paciente saudável; e 3: Banda referente ao fragmento amplificado de 114 pb. **C:** Análise por fluorescência do ensaio com CRISPR/Cas13a. Observa-se que somente quando o DNA alvo estava presente no ensaio houve um forte aumento de fluorescência foi produzida (curva em azul). Em contraste, na ausência de alvo, os ensaios produziram baixa intensidade de fluorescência (curva verde e vermelha).

3.2 Sensibilidade analítica do ensaio

Para determinar a sensibilidade analítica do ensaio baseado em CRISPR/Cas13a, o gDNA de *P. vivax* foi submetido a uma série de diluições de 8 vezes (Figura 3A). A concentração inicial de DNA de *P. vivax* foi de 100 ng/μL, e como apresentado na figura 3B, os resultados mostraram que os sinais de fluorescência na presença de DNA alvo em diferentes concentrações variando de 100 ng/ μL a 0,001 ag/ μL, e claramente foram distintas do controle negativo (curva vermelha). O limite mínimo de detecção proposto de 1,35 pM foi facilmente alcançado pelo sistema PCR-CRISPR/Cas13a (Figura 3B). Observar-se que a reação D1 (100 ng/μL) apresentou a maior intensidade de fluorescência, sugerindo uma relação direta entre a quantidade de DNA presente e o sinal fluorescente. Conforme a concentração de DNA diminui, a intensidade do sinal de fluorescência também diminui, como evidenciado na diluição mais baixa (D8, 0,001 ag/ μL), destacando a sensibilidade do método de detecção mesmo em concentrações reduzidas de DNA.

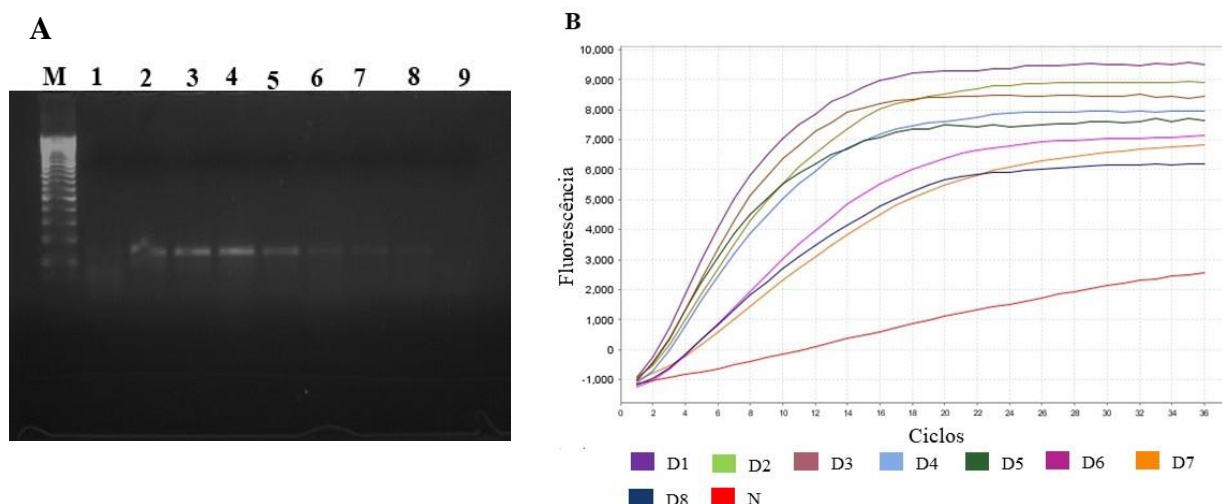


Figura 3: Avaliação da sensibilidade da detecção de *P. vivax* baseada em CRISPR/Cas13a. **A:** Análise das amplificações das diluições de 8 vezes do DNA de *P. vivax* por eletroforese (poço 2-9). Para o controle negativo (poço 1) utilizou-se água livre de nuclease como modelo. **B:** Cinética fluorescente da detecção por CRISPR/Cas13a das diluições de 8 vezes (D1 a D8). CRISPR/Cas13a conseguiu detectar 1,35 pM de DNA.

3.3 Análise do ensaio em amostras clínicas

Com o objetivo de avaliar o potencial diagnóstico do ensaio CRISPR/Cas13a em ambientes clínicos, foram analisados DNAs extraídos de 50 amostras de sangue total. Essas amostras foram obtidas de uma coorte composta por 20 indivíduos saudáveis e 30 indivíduos com resultados positivos para *P. vivax* previamente confirmados por PCR. Os resultados obtidos revelaram que todas as amostras provenientes de indivíduos saudáveis apresentaram resultados negativos, com exceção de uma amostra que apresentou detecção pelo sistema após 90 minutos de incubação (Figura 4A). Por outro lado, das 30 amostras positivas para *P. vivax*, o sistema CRISPR/Cas13a detectou eficientemente 27 delas (Figura 4B). Notavelmente, o sinal de fluorescência foi observado em apenas 10 minutos de incubação para detectar as amostras positivas. Quando comparado com os métodos de PCR, a taxa de concordância positiva para detecção do DNA de *P. vivax* em pacientes diagnosticados com malária foi aproximadamente de 90%, enquanto a taxa de concordância negativa foi de 95%.

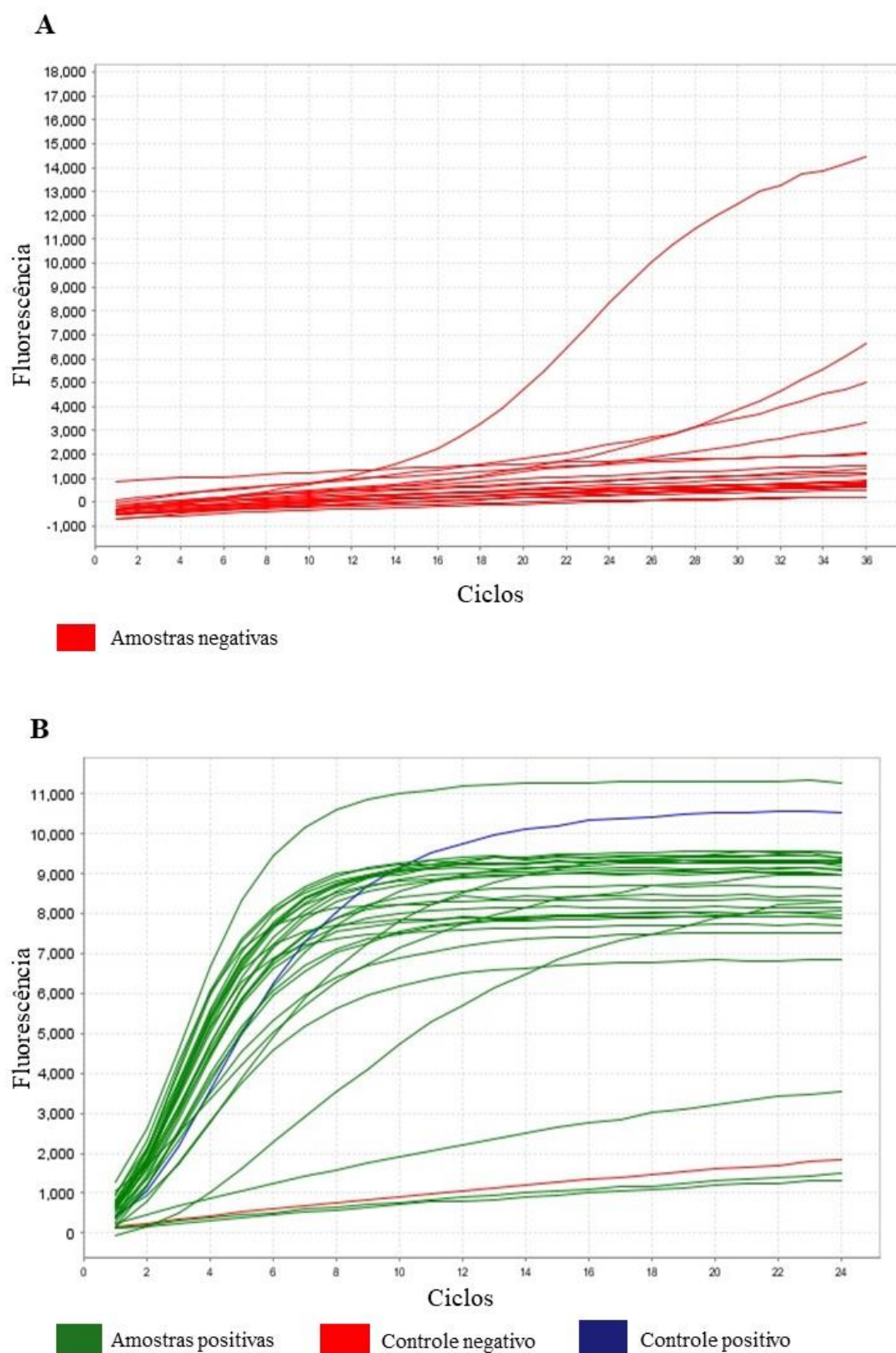


Figura 4: Ensaios por fluorescência do ensaio CRISPR/Cas13a em amostras clínicas. **A:** Análise de 20 amostras negativas para *P. vivax* foram testadas e 19 apresentaram resultados negativos. **B:** Análise de 30 amostras positivas para *P. vivax* foram testadas e 27 apresentaram no ensaio resultados positivos devido ao aumento crescente do nível de fluorescência.

4. DISCUSSÃO

O impacto da malária na saúde global tem desencadeado continuamente a necessidade de desenvolver estratégias de diagnóstico mais eficazes que possam superar as lacunas dos métodos convencionais. Até o momento, nenhum método atendeu a todos os requisitos propostos pela OMS. Portanto, métodos de diagnóstico mais eficazes precisam ser desenvolvidos para colaborar com a redução da transmissão da malária; prevenir a doença grave e morte; reduzir o tratamento presuntivo inadequado; e atenuar o rápido surgimento e propagação da resistência de parasitas aos antimaláricos (Krampa et al., 2020; Land et al., 2018; Murphy et al., 2013). Visto o potencial uso do sistema CRISPR/Cas para diagnóstico molecular, neste estudo, foi realizado um ensaio para detectar *P. vivax* em amostras clínicas através do sistema CRISPR/Cas13a por fluorescência, o qual foi combinado a alta sensibilidade da amplificação por PCR e alta especificidade do complexo crRNA-Cas13a para um fragmento genético de *P. vivax*.

A análise de sensibilidade do método revelou um limite de detecção tão baixa quanto 1,35 pM. Acredita-se que o desempenho altamente sensível deste ensaio seja atribuível a detecção de alvo em duas etapas através da amplificação por PCR, seguida de detecção pelo sistema CRISPR/Cas13a. A PCR foi selecionada como método de amplificação de ácidos nucleicos na primeira etapa devido a possuir vantagens de acessibilidade, disponibilidade de reagentes e resultados experimentais estáveis. A proteína Cas13a de *Leptotrichia wadei* (LwCas13a) foi selecionada por possuir alta sensibilidade de detecção de aproximadamente 50 fM (Gootenberg et al., 2017). Além disso, a Cas13a tem um procedimento adicional de transcrição pela enzima T7, e como resultado do processo de transcrição, o amplicon foi novamente amplificado, produzindo uma detecção ainda mais sensível.

A alta sensibilidade demonstra ser próximo a trabalhos já publicados para malária baseado em CRISPR/Cas por fluorescência. Cunningham et al. observaram um limite de detecção de 31,3 aM (18,8 parasitas/ μ L) para *P. vivax* através da amplificação por RPA combinado a detecção por CRISPR/Cas13a, indicando uma sensibilidade ligeiramente maior da nossa abordagem. No estudo de Lee et al., o ensaio com CRISPR/Cas12a mostrou melhor desempenho de sensibilidade, alcançando um limite de detecção de 50 zM (1,2 parasita/ μ L) para *P. vivax*. No entanto, esse melhor desempenho de Lee et al. foi devido ao volume de amostra de entrada acima de 12 μ L, além de uma etapa adicional de RT-RPA, alta concentração de crRNA e alvos genéticos que estão presentes em maior número de cópias, aproximadamente 20 cópias de DNA mitocondrial para *P. vivax*. Apesar das diferenças nos

protocolos, o desempenho dos ensaios CRISPR/Cas por fluorescência publicados até o momento demonstraram detectar concentrações de parasitas bem abaixo do esperado para malária clínica (Cunningham et al., 2021; Lee et al., 2020; Huang et al., 2023; Wei et al., 2023). É pertinente salientar que a concentração mínima estabelecida neste trabalho (1,35 pM) foi prontamente alcançada, portanto, para aprimorar ainda mais a sensibilidade do ensaio e atingir o limite mínimo de detecção, serão realizados estudos futuros com concentrações ainda mais reduzidas para permitir uma avaliação mais precisa da capacidade de detecção do método proposto.

Em ambiente clínico, os ensaios indicaram bom desempenho na detecção de *Plasmodium vivax* em amostras clínicas. Das 30 amostras positivas previamente testadas em PCR e microscopia, 27 amostras apresentaram resultados positivos, indicando uma sensibilidade clínica satisfatória do ensaio, pois conseguiu identificar corretamente uma grande proporção das amostras que realmente possuíam *P. vivax*. No entanto, foi observado a presença de 3 falsas-negativas que o ensaio não conseguiu detectar *P. vivax*. Um aspecto importante a ser observado é que devido ao longo tempo de armazenamento combinado ao processo de descongelamento das amostras, podem ter levado a um aumento da degradação do DNA e, devido a isso, o ensaio foi mais propenso a resultados falso-negativos. Das 20 amostras negativas submetidas, 19 o ensaio não detectou a presença de *P. vivax* e 1 apresentou resultado falso-positiva, e isso indica uma especificidade aceitável do ensaio, pois não houve uma quantidade significativa de falsas-positivas. No entanto, é importante investigar se essa amostra falsa-positiva foi corretamente classificada como negativa ou se houve alguma contaminação durante a etapa de transferência do amplicon para reação de detecção CRISPR. Independentemente disso, estes resultados sugerem que o CRISPR/Cas13a proporciona excelente especificidade para detecção de malária, embora sejam necessárias mais avaliações neste parâmetro com maior número de amostras clínicas.

Ao considerar a aplicabilidade clínica do ensaio PCR-CRISPR/cas13a, todas as etapas podem ser facilmente implementadas na maioria dos laboratórios clínicos, uma vez que dependem de procedimentos de amplificação por PCR de rotina e equipamentos de uso convencional. Além disso, considerando juntamente os tempos da PCR e do teste de detecção CRISPR/Cas13a, toda a reação pode ser concluída em apenas 2 horas, com 80 minutos de PCR e 40 minutos referentes ao ensaio CRISPR/Cas13a.

Embora uma detecção com sensibilidade e especificidade clínica eficiente do ensaio PCR-CRISPR/Cas13a tenha sido alcançada, existem algumas limitações importantes a

serem observadas nesta metodologia. Primeiro, o desempenho do ensaio foi avaliado apenas com base em um tamanho limitado de amostras clínicas, o que pode ter diminuído a importância da nossa conclusão. Em segundo lugar, o ensaio depende de uma etapa adicional de amplificação por PCR, que requer tempo prolongado para gerar mais produtos de amplificação, geralmente entre 1 hora e meia a 2 horas de reação. Estudos anteriores demonstraram que o método de amplificação por RPA combinado a detecção CRISPR/Cas pode alcançar melhorias quanto ao tempo de ensaio e simplicidade em comparação com a PCR convencional (Cao et al., 2022; Puig et al., 2021). Assim, a integração da amplificação RPA no ensaio CRISPR/Cas13a será investigada em estudos futuros para o desenvolvimento de detecção de malária mais prático e simples.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, propusemos um ensaio de diagnóstico baseado em CRISPR/Cas13a combinado com amplificação por PCR para detectar *P. vivax* em amostras clínicas. Nossos resultados demonstraram que com iniciadores de PCR adequados e crRNA específico para o fragmento genético alvo, este método foi capaz de oferecer boa sensibilidade e especificidade, além de fornecer uma abordagem alternativa para identificar a infecção por *P. vivax* de maneira fácil e oportuna.

FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

Alemayehu S., Feghali K. C., Cowden J., Komisar J., Ockenhouse C. F., et al. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. *Malar J.* v. 12, p. 277, 2013.

Britton S., Cheng Q., McCarthy J. S. Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: a review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings. *Malar J*, v. 15, n. 88, 2016.

Cao G., Huo D., Chen X., Wang X., Zhou S., et al. Automated, portable, and high-throughput fluorescence analyzer (APHF-analyzer) and lateral flow strip based on CRISPR/Cas13a for sensitive and visual detection of SARS-CoV-2. *Talanta*, v. 248, p. 123594, 2022.

Chakraborty, J., Chaudhary, A. A., Khan, S. U. D., Rudayni, H. A., Rahaman, S. M., et al. CRISPR/Cas-Based Biosensor As a New Age Detection Method for Pathogenic Bacteria. *ACS Omega*, v. 7, n. 44, p. 39562–39573, 2022.

Cunningham C. H., Hennelly C. M., Lin J. T., Ubalee R., Boyce R. M., et al. A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of Plasmodium detection, species differentiation, and drug-resistance genotyping. *EBioMedicine*, v. 68, p. 103415, 2021.

de Puig H., Lee R. A., Najjar D., Tan X., Soeknsen L. R., et al. Minimally instrumented SHERLOCK (miSHERLOCK) for CRISPR-based point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 and emerging variants. *Sci Adv*, v. 7, n. 32, p. eabh2944, 2021.

da Veiga G. T. S., Moriggi M. R., Vettorazzi J. F., Müller-Santos M., Albrecht L. *Plasmodium vivax* vaccine: What is the best way to go? *Front Immunol*, v. 13, p. 910236, 2023.

Dueñas E., Nakamoto J. A., Cabrera-Sosa L., Huaihua P., Cruz M., et al. Novel CRISPR-based detection of *Leishmania* species. *Front Microbiol.*, v. 13, p. 958693, 2022.

Feachem R. G., Phillips A. A., Targett G. A., Snow R. W. Call to action: priorities for malaria elimination. *Lancet*. v. 376, n. 9752, p. 1517-21, 2010.

Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Lee J. W., Essletzbichler P., Dy A. J., et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, v. 356, n. 6336, p. 438-442, 2017.

He Y., Yan W., Long L., Dong, L., Ma, Y., et al. The CRISPR / Cas System : A Customizable Toolbox for Molecular Detection. *Genes*, v. 14, p. 850, 2023.

Huang T., Zhang R., Li J. CRISPR-Cas-based techniques for pathogen detection: Retrospect, recent advances, and future perspectives. *J Adv Res.*, v. 50, p. 69-82, 2023.

Huang W., Wei H., Wang C., Wang J., Chen L., et al. Establishment and preliminary evaluation of a fluorescent recombinase-aided amplification/CRISPR-Cas12a system for rapid detection of *Plasmodium falciparum*. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*, v. 35, n. 1, p. 38-43, 2023.

Kellner M. J., Koob J. G., Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Zhang F. SHERLOCK: detecção de ácido nucleico com nucleases CRISPR. *Protocolo Nat*, v. 14, n. 10, p. 2986-3012, 2019.

Krampa F. D., Aniweh Y., Kanyong P., Awandare G. A. Recent Advances in the Development of Biosensors for Malaria Diagnosis. *Sensors (Basel)*, v. 20, n. 3, p. 799, 2020.

Lee R. A., De Puig H., Nguyen P. Q., Angenent-Mari N. M., Donghia N. M., et al. Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of Plasmodium species in symptomatic and asymptomatic malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 41, p. 25722–25731, 2020.

- McMorrow M. L., Aidoo M., Kachur S.P. Malaria rapid diagnostic tests in elimination settings--can they find the last parasite? *Clin Microbiol Infect*, v. 17, n. 11, p. 1624-31, 2011.
- Ministério da Saúde, S. de V. EM S. Dia mundial de luta contra a malária. *Boletim Epidemiológico*, v. 52, n. 15, p. 1–27, 2021.
- Murphy S. C., Shott J. P., Parikh S., Etter P., Prescott W. R., et al. Malaria diagnostics in clinical trials. *Am J Trop Med Hyg*, v. 89, n. 5, p. 824-39, 2013.
- Nourani L., Mehrizi A. A., Pirahmadi S., Pourhashem Z., Asadollahi E., et al. CRISPR/Cas advancements for genome editing, diagnosis, therapeutics, and vaccine development for *Plasmodium* parasites, and genetic engineering of *Anopheles* mosquito vector. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 109, p. 105419, 2023.
- OMS (2021). Relatório mundial sobre malária 2021. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240064898>.
- OMS (2022). Relatório mundial sobre malária 2022. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240064898>.
- Rahimi B. A., Thakkestian A., White N. J., Sirivichayakul C., Dondorp A. M., et al. Malária vivax grave: uma revisão sistemática e meta-análise de estudos clínicos desde 1900. *Malar J*, v. 13, p. 481, 2014.
- Sun Y., Yu L., Liu C., Ye S., Chen W., et al. One-tube SARS-CoV-2 detection platform based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a. *J of Trans Med*, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2021.
- Tiono A. B., Ouédraogo A., Diarra A., Coulibaly S., Soulama I., et al. Lessons learned from the use of HRP-2 based rapid diagnostic test in community-wide screening and treatment of asymptomatic carriers of *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso. *Malar J*, v. 13, p. 30, 2014.
- Wang J., Yang X., Wang X., Wang, W. Recent Advances in CRISPR/Cas-Based Biosensors for Protein Detection. *Bioengineering*, v. 9, n. 10, 2022.
- Wang X., Shang X., Huan X. Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods. *Emerging Microbes & Infections*, v. 9, n. 1, p. 1682, 2020.
- Wei H., Li J., Liu Y., Cheng W., Huang H., et al. Rapid and Ultrasensitive Detection of *Plasmodium* spp. Parasites via the RPA-CRISPR/Cas12a Platform. *ACS Infect Dis*, v. 9, n. 8, p. 1534-1545, 2023.
- Yan F., Wang W., Zhang J.. CRISPR-Cas12 and Cas13: the lesser known siblings of CRISPR-Cas9. *Cell Biol Toxicol*, v. 35, n. 6, p. 489-492, 2019.
- Yuan B., Yuan C., Li L., Long M., Chen Z. Application of the CRISPR/Cas System in Pathogen Detection: A Review. *Molecules*, v. 27, n. 20, p. 6999, 2022.
- Zheng Z., Cheng Z. Advances in Molecular Diagnosis of Malaria. *Adv Clin Chem*, v. 80, p. 155-192, 2017.

CAPÍTULO 3

6. CAPÍTULO 3: ARTIGO ORIGINAL

Neste capítulo é apresentado o objetivo específico 3 deste trabalho, o qual foi desenvolver um biossensor eletroquímico baseado no sistema CRISPR/Cas13a para detecção molecular de *Plasmodium vivax*, utilizando a imobilização de oligonucleotídeo na superfície de eletrodos SPCE/STV. O biossensor projetado pode oferecer uma abordagem simples para detecção molecular, com alvos específicos de interesse patogênicos ou genéticos. Durante o estudo, foram utilizados eletrodos modificados com estreptavidina, que permitiram a imobilização do oligonucleotídeo com biotina. Foram realizados ensaios para otimizar a quantidade de oligonucleotídeo imobilizado na superfície dos eletrodos, visando garantir a melhor resposta elétrica através das técnicas voltamétricas. Testes de funcionamento do biossensor utilizando a enzima RNase A mostraram que o oligonucleotídeo foi projetado de maneira satisfatória, visto que a enzima clivou na sequência de ssRNA no oligo, gerando mudanças de sinal de corrente por VDP e VC. A interação entre o sistema CRISPR/Cas13a e o alvo molecular (*P. vivax*) resultou em mudanças mensuráveis nas propriedades eletroquímicas do biossensor. Além disso, o biossensor eletroquímico apresentou boa reprodutibilidade, demonstrando possuir potencial para aplicações em detecção molecular. Em resumo, o desenvolvimento deste biossensor em conjunto com o sistema CRISPR/Cas13a pode oferecer futuramente uma abordagem promissora para identificação molecular rápida e precisa em uma variedade de alvos clínicos e científicos.

Informações sobre o artigo original:

Título: Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado no sistema CRISPR/Cas13a para detecção molecular de *Plasmodium vivax*.

Situação:

Em revisão para publicação.

Revista a ser submetida:

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO NO SISTEMA CRISPR-Cas13a PARA DETECÇÃO MOLECULAR DE *Plasmodium vivax*

D. S. Mota^{1,2}, A. M. D. Gandarilla^{3,4}, W. R. Brito^{3,4} L. A. M. Mariúba^{1,2,5}

- 1- Laboratório de diagnóstico e controle de doenças infecciosas na Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane – Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz (ILMD-FIOCRUZ), Manaus, AM, 69057-070, Brasil;
- 2- Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-005, Brasil;
- 3- Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-005, Brasil;
- 4- Laboratório de Bioeletroquímica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-005, Brasil;
- 5- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;

Autor correspondente: Luis André Morais Mariúba
Email: andre.mariuba@fiocruz.br

Resumo: O sistema de repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente inter espaçadas (CRISPR) e as proteínas associadas (Cas) fornece uma nova ferramenta de diagnóstico para o desenvolvimento de plataformas de biossensores devido à sua alta customização e precisão de alvo. A descoberta recente da atividade de “clivagem colateral” da proteína Cas13a torna o sistema CRISPR uma tecnologia potencial de detecção de alta sensibilidade e especificidade de base única. Portanto, neste estudo, foi realizada a prova de conceito de um biossensor baseado em CRISPR/Cas13a combinado a amplificação por RPA para detecção específica de ácidos nucleicos de *P. vivax* através de métodos eletroquímicos por voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria cíclica (VC). Para preparação do biossensor, o oligonucleotídeo ssDNA-ssRNA foi imobilizado na superfície de eletrodos impressos de carbono modificados com estreptavidina (SPCE/STV). Os resultados mostraram que nas amostras positivas, o CRISPR/Cas13a reconheceu especificamente a molécula alvo que desencadeou a atividade de clivagem colateral de Cas13a. O complexo CRISPR/Cas13a clivou no local do ribonucleotídeo do oligonucleotídeo, gerando um

aumento de corrente do sistema, o qual foi registrado por VPD. Assim, o biossensor baseado em CRISPR/Cas13a desenvolvido neste estudo pode fornecer um método específico e simples para detecção molecular de *Plasmodium vivax*.

Palavras-chave: CRISPR/Cas13a; biossensor eletroquímico; detecção molecular; *P. vivax*

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos nucleicos, incluindo o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA), são moléculas indispensáveis e que existem amplamente em todas as células animais e vegetais e em microrganismos. Os ácidos nucleicos têm sido importantes biomarcadores para estudos em vários campos, incluindo no diagnóstico médico, monitoramento da segurança alimentar e detecção de toxinas ambientais (Huang et al., 2014; Mölsä et al., 2012; Qian et al., 2018). As técnicas baseadas em ácidos nucleicos visam detectar a sequência específica de ácidos nucleicos amplificando em milhões de vezes. Isso geralmente fornece resultados mais precisos e oportunos em comparação com imunoenaios e métodos de cultura tradicionais. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método de detecção mais antigo e continua sendo o padrão ouro na detecção molecular. Embora a PCR seja um método importante na detecção de ácidos nucleicos, a exigência de pessoal bem treinado e ambiente laboratorial caro limita sua aplicação na detecção em campo e em áreas com baixos recursos (Almasi et al., 2013; Karthik et al., 2014). Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias eficientes para a detecção rápida e de baixo custo para ácidos nucleicos é necessária.

Recentemente, houve desenvolvimento significativo no uso do sistema CRISPR/Cas para o diagnóstico molecular (Ding et al., 2020; Hong et al., 2023; Zhou et al., 2020). Esta tecnologia de detecção de ácidos nucleicos é baseada em proteínas associadas ao CRISPR (Cas) que reconhecem a sequência alvo e subsequentemente clivam moléculas de DNA ou RNA. Entre os sistemas CRISPR, o CRISPR/Cas13a possui a capacidade de identificar RNA de fita simples e clivar indiscriminadamente moléculas de RNA repórter circundante, conhecida como clivagem colateral, gerando sinais registráveis proporcionais à concentração de alvo (Abudayyeh et al., 2016). Para melhorar a sensibilidade do método, Gootenberg et al. integrou a amplificação isotérmica da amplificação da polimerase recombinase (RPA) para desenvolver um método de diagnóstico com sensibilidade

atomolar e especificidade de incompatibilidade de base única (denominado SHERLOCK) (Gootenberg et al., 2017).

Nos últimos anos, os biossensores experimentaram um crescimento sem precedentes e tornaram-se uma das ferramentas de detecção mais promissoras devido a vários benefícios analíticos, eficiência e custos (Castillo-Henriquez et al., 2020). Os biossensores geralmente são compostos por três partes principais: uma camada de reconhecimento molecular, um transdutor e um gerador de sinal. Normalmente, a camada de reconhecimento molecular é produzida pela imobilização de um biorreceptor na superfície do transdutor para permitir a detecção específica de um analito alvo. Depois que o biorreceptor interage ao analito, um sinal mensurável pode ser gerado pelo transdutor através de mudanças na estrutura da molécula por meio da reação química (Hoa et al., 2007). Em comparação com as estratégias de detecção existentes, os biossensores eletroquímicos ocupam uma posição importante entre os sensores atuais, devido ao baixo custo, facilidade de uso, portabilidade, capacidade de produção em massa e simplicidade da estrutura, que os tornam um elemento adequado de reconhecimento molecular atrelado a CRISPR/Cas para detecção em POC (Kozovska et al., 2021; Muzyka, 2014).

Diante do exposto, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico baseado no sistema CRISPR/Cas13a, combinando a alta especificidade da proteína Cas13a com os recursos de amplificação rápida do RPA, fornecendo um teste prático e rápido em comparação com os ensaios de PCR tradicionais. Nesta abordagem, o biossensor foi facilmente fabricado por meio da imobilização de um oligonucleotídeo com biotina sobre a superfície do eletrodo SPCE/STV, e avaliado utilizando a VPD e VC na presença de solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ como sonda redox. Com o reconhecimento do alvo pelo complexo CRISPR/Cas13a, a atividade de clivagem colateral de Cas13a é ativada e depositada sobre o SPCE/STV/Oligo, levando a degradação da região de RNA do oligonucleotídeo. Um aumento de corrente é observado, já que a clivagem do oligo permite que a corrente passe com maior facilidade desde a solução eletrolítica ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$) até a superfície do eletrodo. Na ausência de alvo, a atividade colateral permanece inativada e, consequentemente, sem alteração do sinal de corrente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e materiais

Neste estudo, os oligonucleotídeos, incluindo o conjunto de primers e crRNA, foram sintetizados pela empresa IDT bioscience (Integrated DNA Technologies) (Tabela 1). Os

SPCE/STV, modelo DRP-110STR, foram adquiridos da Metrohm DropSens (Oviedo, Espanha), os quais estão constituídos por um eletrodo de trabalho de carbono funcionalizado com estreptavidina, um eletrodo de referência de Ag/AgCl e um contra-eletrodo de carbono. As medidas eletroquímicas foram realizadas no potenciostato PGSTAT128N da Metrohm Autolab (Países Baixos). KCl, Tris, $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O kit de amplificação RPA foi adquirido da empresa TwistDx, (Cambridge, UK). Kits de T7 RNA Polimerase foram adquiridos da ThermoFisher Scientific (Massachusetts, EUA). Para purificação do crRNA foi adquirido o kit com esferas magnéticas da Beckman Coulter (EUA). O kit para extração de gDNA foi adquirido da ThermoFisher Scientific. As amostras de sangue foram adquiridas da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (CEP/FMT-HVD) (Manaus, Brasil).

2.2 Desenvolvimento do biossensor baseado em CRISPR/Cas13a

O princípio de funcionamento do biossensor eletroquímico baseado em CRISPR/Cas13a é esquematicamente ilustrado na Fig. 1. Detalhes da preparação, funcionalização e possível aplicação do biossensor foram investigas neste estudo.

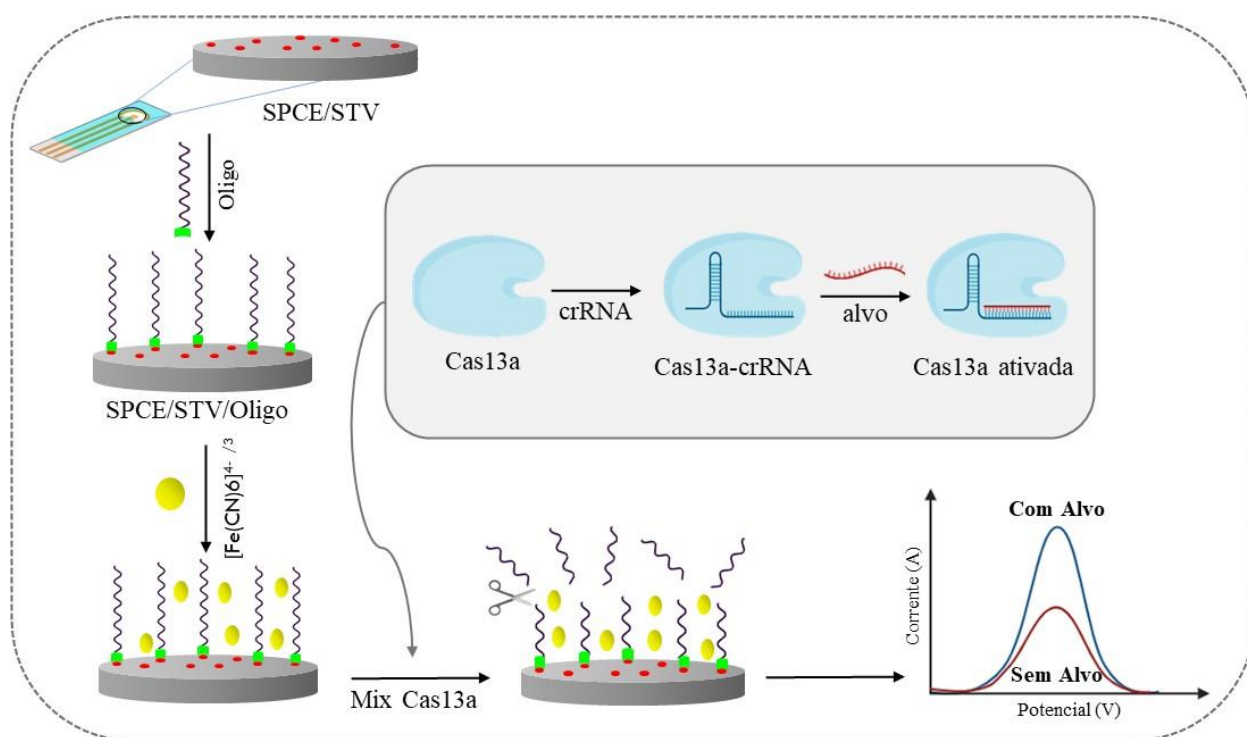


Figura 1: Ilustração esquemática das etapas de fabricação do biossensor baseado em CRISPR/Cas13a e posterior detecção do analito alvo. Fonte: Autoria.

2.3 Preparação dos oligonucleotídeos

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo são apresentados na Tabela 1. Os iniciadores para RPA foram projetados com base na região do gene *pvmdr-1* (transportador de multirresistente-1 de *P. vivax*). Os iniciadores foram desenhados com base nas sequências depositadas no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e projetadas utilizando o programa Primer-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Foi adicionado uma sequência promotora de T7 à extremidade 5' do iniciador *forward* para permitir a transcrição *in vitro* pela polimerase T7 durante a etapa de detecção de CRISPR/Cas13a.

O crRNA foi desenhado de acordo com as características da proteína LwCas13a. Primeiramente, os oligonucleotídeos para a síntese de crRNA foram projetados como dois oligonucleotídeos de DNA de cadeia simples (ssDNA) complementares e depois transcritos *in vitro* para produzir crRNAs de fitas simples. Cada oligonucleotídeo de ssDNA é composto de três partes: uma região espaçadora variável (para facilitar o reconhecimento da molécula alvo de RNA), uma região conservadora (para facilitar a associação de crRNA com a proteína Cas13a) e uma sequência promotora T7 (para facilitar a transcrição *in vitro* de crRNA). Posteriormente, os oligonucleotídeos ssDNA complementares foram emparelhados (concentração final de 10 µmol cada) por 5 minutos a 95°C para formar DNA de cadeia dupla (dsDNA). Os modelos de dsDNA formados foram transcritos *in vitro* utilizando o kit de síntese de RNA da Invitrogen (ThermoFisher). As reações foram realizadas em volume de 30 µL a 37 ° C por 16 h seguindo as instruções do fabricante para transcritos curtos de RNA. Finalmente, os transcritos de crRNA foram tratados e purificados com um kit de limpeza de RNA.

O oligonucleotídeo com biotina sintético utilizado neste estudo teve como base a estratégia proposta por Sato & Shigeori (2013), utilizando sequências de fita simples de DNA e uma sequência de RNA. Foi adicionado uma biotina na extremidade 5', que facilitou a imobilização do oligonucleotídeo na superfície dos SPCE/STV.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Oligonucleotídeos	Sequências 5'→ 3'	Nº
Par de primers <i>pvdmr-1</i>	Forward: <u>GAAATTAATACGACTCACTATAGGG</u> TTAGCAAC TCCATAAAGAACAACATCAA	53
	Reverse: CTGTTGGAATCACTTTGAGAAGAAAAAC	28
crRNA	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGG GGACUAAAACCUCCCUCCGAUAAGGUUCUAAAUCUUUC	64
Oligo	Biotina-CCCCCCCCCCCCCAAArCAAAT	22

*Sublinhado: sequência referente a região promotora T7

2.4 Amplificação do alvo por RPA

Um fragmento do gene *pvdmr-1* (114 pb) foi amplificado a partir de gDNA de *P. vivax* por RPA. As reações foram realizadas conforme descrito no TwistAmp Basic Instruction Manual (TwistDx, Cambridge, UK), com algumas modificações. Cada reação RPA de 40 µL foi subdividida em quatro reações de 10 µL em microtubos. Resumidamente, os 40 µL de master mix (2,4 µL de cada iniciador, 29,5 µL de Rehydration Buffer e 8,65 µL de H₂O Milli-Q) foram transferidos a uma única alíquota de pellets e ressuspensos cuidadosamente em gelo. Em seguida, 2,5 µL de acetato de magnésio TwistAmp (280 mmol L⁻¹) foi adicionado a reação. Alíquotas de 10 µL de reação de RPA foram transferidas em microtubos de PCR e adicionado 1 µL de amostra de gDNA. As reações foram executadas à 37°C em uma incubadora por 30 minutos. Após esse período, as reações foram interrompidas colocando os tubos no gelo e armazenadas a -20.

2.5 Modificação do eletrodo SPCE/STV

O processo da modificação do eletrodo foi conduzido com a imobilização do oligonucleotídeo ssDNA-ssRNA através do gotejamento de 10 µL de solução de oligo sobre a superfície do eletrodo de trabalho do SPCE/STV, uma vez que esta quantidade foi o suficiente para o total cobrimento da superfície do eletrodo de trabalho (4mm de diâmetro). Foram avaliadas diferentes concentrações de oligo (entre 0,1 e 2 µmol L⁻¹). Posteriormente, a superfície do eletrodo foi lavada cuidadosamente com água livre de nucleases para remover

as moléculas que não foram incorporadas na superfície do eletrodo. Em seguida, o biossensor preparado foi seco com nitrogênio gasoso (99% de pureza) e armazenados a 4°C até a utilização.

Primeiramente, para avaliar o desempenho do biossensor eletroquímico foi utilizado como controle positivo a enzima nuclease RNase A (1×10^{-12} g mL⁻¹), onde foi incubado o eletrodo por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação, o biossensor foi lavado cuidadosamente com água livre de nucleases.

As etapas de modificação do eletrodo foram estudadas usando o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ contendo KCl 0,1 M, sendo avaliados os processos de passivação do eletrodo antes e após a clivagem do oligonucleotídeo sobre SPCE/STV. Foi utilizado como técnicas eletroquímicas a VPD na faixa de potencial de -0,2 a 0,5V, com velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹ e amplitude de pulso de 0,005 V, e VC na faixa de -0,6 a 0,8V e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

2.6 Ensaio Eletroquímico CRISPR/Cas13a

Para detecção do alvo *P. vivax*, a reação CRISPR/Cas13a foi preparada em um tampão contendo LwaCas13 ($63,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), crRNA ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), rNTP (25 mmol L^{-1}), inibidor de RNase ($40 \text{ U}/\mu\text{L}$) Tris-HCl (40 mmol L^{-1}) e T7 RNA Polimerase ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$) misturados com 1 μL de amostra pré-amplificada por RPA. Um volume de 10 μL da solução CRISPR/Cas13a foram depositados no eletrodo de trabalho em temperatura a 37°C de deixada por 30 minutos de incubação. Após a lavagem com água livre de nucleases, 100 μL de solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mmol L^{-1}) + KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram depositados cobrindo a área dos três eletrodos e medida a resposta eletroquímica por VPD. Ensaios similares foram realizados com a reação CRISPR/Cas13a sem o fragmento alvo, sendo esses considerados como controle negativo, seguindo o protocolo acima descrito.

Além disso, foi realizado o estudo de reprodutibilidade do método, para o qual foram preparados 3 eletrodos sob as mesmas condições experimentais e medida a resposta eletroquímica por VPD em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mmol L^{-1}) + KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) antes e após incubação em amostras positivas e negativas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização da concentração de oligo em SPCE/STV

Para conduzir medições eletroquímicas, é essencial utilizar uma sonda redox que permita a transferência de elétrons do eletrodo de trabalho para o contra-eletrodo. Neste estudo, foi empregado o par redox ferri/ferrocianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4+} + \text{KCl}$) devido à sua alta taxa de transferência de elétrons, que é de aproximadamente 2×10^{-2} cm/s. Durante as medições, a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4+}$ difunde-se através da solução até a superfície do eletrodo, a qual é polarizada pela aplicação de potencial no sentido anódico (positivo) e catódico (negativo). Na superfície do eletrodo, ocorrem processos redox envolvendo as espécies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, dependendo do arranjo biológico presente na camada adjacente ao eletrodo. Quanto mais obstruída estiver essa camada, menores serão os valores de corrente de pico registrados, devido à reduzida transferência de elétrons de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Esse fenômeno permite monitorar o reconhecimento biológico ocorrido na superfície do eletrodo (Angell et al., 1972; Haji-Hashemi et al., 2019).

Na fabricação do biossensor, empregou-se um oligonucleotídeo ssDNA-ssRNA modificado na sua extremidade 5' com biotina, o que desempenhou um papel crucial na imobilização do oligo na superfície do eletrodo de trabalho modificado estreptavidina (Sato & Shigeori, 2013). Inicialmente, foi otimizado a quantidade de oligonucleotídeo avaliando diferentes concentrações, variando de 0,1 a 2 μM . Como evidenciado na Fig. 2, observar-se através de VPD que as concentrações de oligo de 1 e 2 μM registraram os menores valores de corrente de pico anódica, resultando de forma mais eficaz como uma camada isolante para a difusão de redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Foi observado que o aumento da concentração de oligo no SPCE/STV reduziu proporcionalmente a corrente eletroquímica. Portanto, adotamos a concentração de 2 μM de oligonucleotídeo em todos os experimentos subsequentes devido à sua ótima relação sinal-fundo

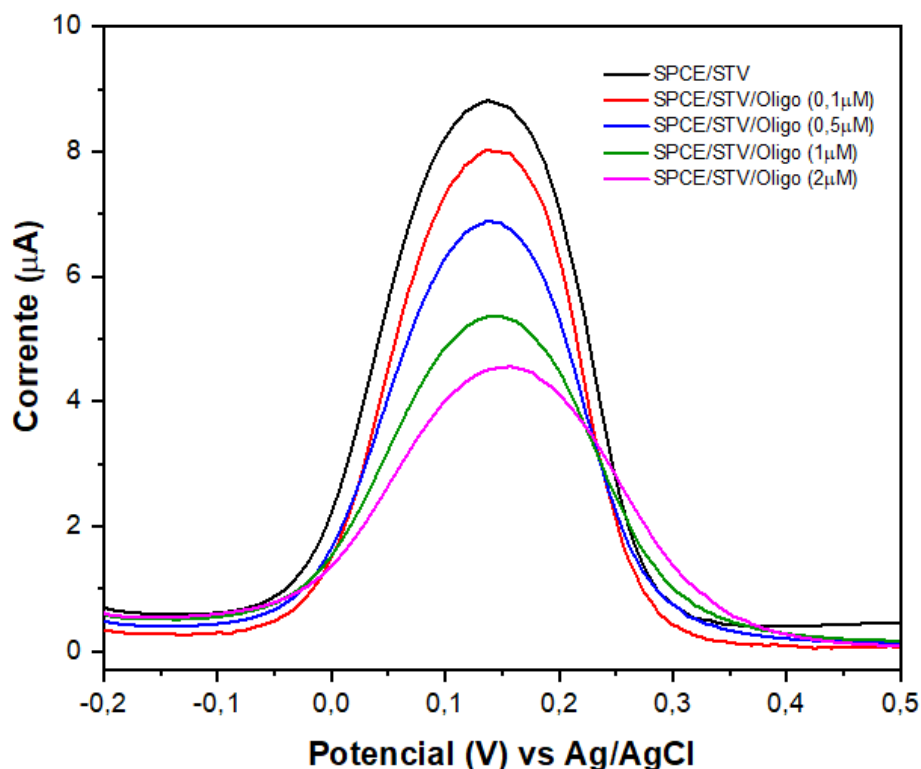


Figura 2: Otimização da concentração de oligonucleotídeo para o biossensor eletroquímico baseado em CRISPR/Cas13a. Correntes eletroquímicas observadas por VPD em diferentes concentrações de oligo (0,1; 0,5; 1; e 2,0 µM).

3.2 Funcionalização do biossensor

A VC e a VDP foram empregadas posteriormente para monitorar as etapas da funcionalização do biossensor eletroquímico e posterior atividade da enzima RNase A (Fig. 3). Os gráficos A e B evidenciam claramente que a cinética de transferência de elétrons de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ varia de uma etapa para outra. Na VC foi observado para o SPCE/STV sem oligo, um voltamograma quase-reversível bem definido, com os maiores valores de correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}), e menores valores de variação de potencial de pico (ΔE), (Tabela 2). Após a imobilização do oligo na superfície do eletrodo, o perfil voltamétrico mudou, registrando diminuição nos valores de I_{pa} e I_{pc} e um deslocamento nos potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) quando comparado a etapa anterior. Este comportamento indica a formação de uma camada de bloqueio, embora não tenha impedido completamente a difusão do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em direção à superfície do SPCE/STV. Após a etapa de incubação com RNase A, os valores de I_{pa} e I_{pc} aumentam, sendo mais similares ao SPCE/STV/Oligo, sugerindo a clivagem no local do ribonucleotídeo do oligo

pela enzima. O mesmo comportamento foi exibido nos voltamogramas registrados por VPD, uma diminuição na Ipa após a imobilização do oligo, e um aumento na Ipa após a atividade RNase, indicando que o biossensor operou de forma satisfatória em ambas as técnicas eletroquímicas (Figura 3A e B) (Tabela 2).

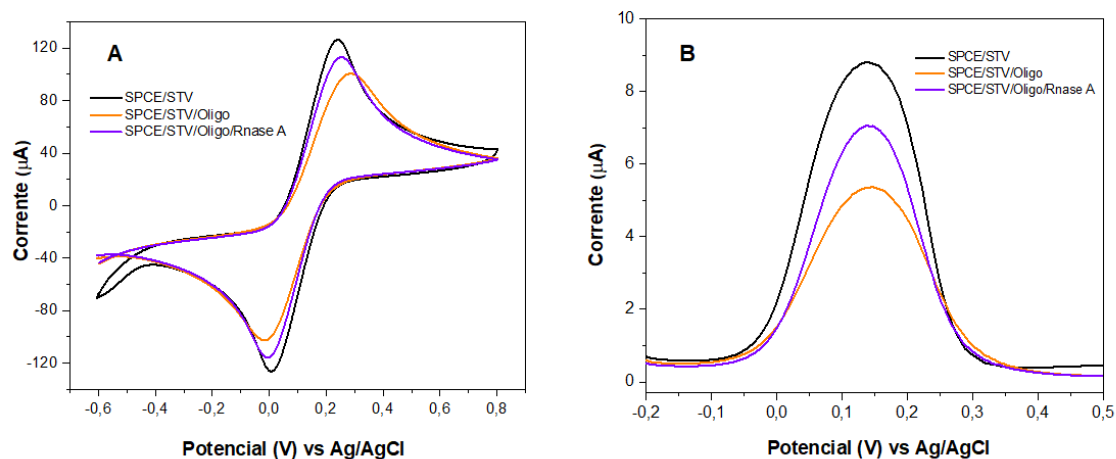


Figura 3: Comportamento eletroquímico registrado por (A) VC e (B) VPD em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-} + \text{KCl}$ durante as etapas de funcionalização do SPCE/STV e posterior atividade RNase.

Tabela 2: Valores dos parâmetros eletroquímicos para o sistema SPCE/STV/Oligo/RNase A.

Eletrodo modificado	VPD		VC				
	Ipa(µA)	Epa(V)	Ipa(µA)	Epa(V)	Ipc(µA)	Epc(V)	ΔEp(mV)
SPCE/STV	8,81	0,137	126,34	0,239	-126,27	0,007	232
SPCE/STV/Oligo	5,36	0,144	100,49	0,286	-102,70	-0,016	302
SPCE/STV/Oligo/RNase A	7,06	0,143	113,11	0,252	-116,02	-0,005	258

3.3 Detecção eletroquímica baseada CRISPR/Cas13a

Para desenvolver ensaios eletroquímicos baseados em CRISPR/Cas13a, inicialmente foi realizado a amplificação do material genético de *P. vivax* utilizando a tecnologia RPA. Um par de iniciadores foi selecionado para amplificar um fragmento de 114 pb do gene *pvmdr-1*. A reação RPA foi conduzida a 37°C por 30 minutos, resultando em uma eficiente amplificação do DNA dentro desse período. Em seguida, o DNA amplificado foi submetido ao mix contendo Cas13a, onde o complexo CRISPR/Cas13a reconheceu o alvo específico e ativou a clivagem colateral, resultando na degradação do oligonucleotídeo na superfície do

eletrodo. Por outro lado, na ausência do fragmento alvo, o mecanismo de clivagem não foi ativado e o oligonucleotídeo permaneceu intacto no SPCE/STV (Fig. 1).

Como mostrado na Fig. 4, o voltamograma do SPCE/STV por VPD revelou o pico de oxidação do ferro de forma bem definida, sendo a $I_{pa}=8,81\mu A$. Posteriormente, observou-se uma diminuição significativa no valor após a imobilização do oligonucleotídeo ($I_{pa}=5,36\mu A$). Esse fenômeno pode ser atribuído à estrutura do oligonucleotídeo, que atuou como uma barreira à transferência de elétrons entre o eletrodo e o $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Quando a reação CRISPR/Cas13a ativada por alvo foi depositada no SPCE/STV/Oligo, um aumento significativo no valor de corrente foi observado ($I_{pa}=9,54\mu A$), que foi atribuído a facilidade da transferência de elétrons de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ na superfície do eletrodo devido a clivagem do oligo pelo sistema CRISPR/Cas13a (SPCE/STV/Oligo/Positivo). Na ausência de alvo (SPCE/STV/Oligo/Negativo), a atividade colateral de Cas13a permaneceu inativada, e não houve notáveis mudanças nos valores de corrente ($I_{pa}=5,74\mu A$), já que o oligo foi preservado. Em geral, estes resultados indicaram que o biossensor consegue diferenciar exitosamente entre amostras positivas e negativas.

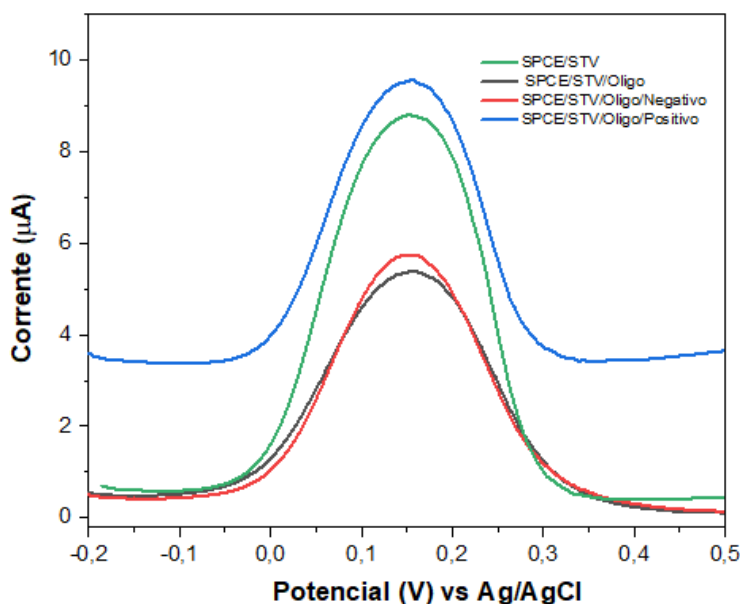


Figura 4: Comportamento eletroquímico por VPD em solução de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}+KCl$ após detecção do analito alvo usando o biossensor baseado em CRISPR/Cas13a após a amplificação por RPA (amostra positiva e negativa).

No estudo de reprodutibilidade, foram comparados os valores de I_{pa} obtidos por VPD para os biossensores fabricados. A resposta foi medida para os três SPCE/SPT/Oligo e após incubação em amostras negativas e positivas. Conforme ilustrado na Fig. 5, a resposta dos três biossensores foi similar, sem notáveis mudanças de corrente após incubação em amostras negativas, e um aumento significativo nos valores de I_{pa} quando os eletrodos foram incubados em amostras positivas (contendo o analito alvo). Esses resultados são consistentes com os dados de VDP apresentados na Fig. 4, sugerindo que o biossensor proposto é funcional e pode ser aplicado de forma eficaz na detecção molecular.

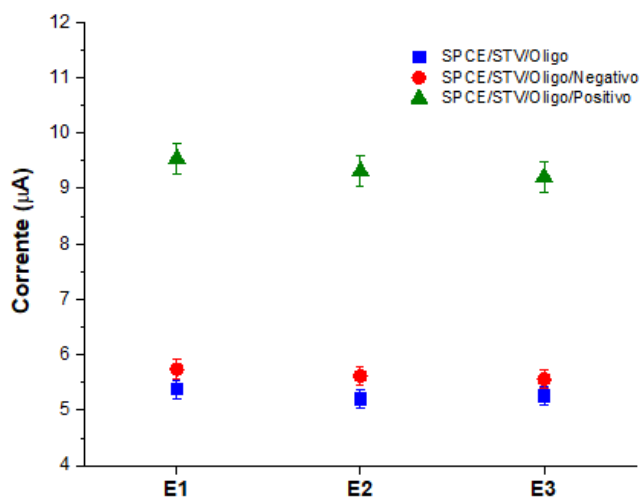


Figura 5: Estudo de reprodutibilidade do biossensor eletroquímico baseado CRISPR/Cas13a por VDP em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-} + \text{KCl}$.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, desenvolvemos um biossensor eletroquímico baseado no sistema CRISPR/Cas13a combinado com a técnica de amplificação por RPA para fornecer um método de detecção molecular. O teste exibiu especificidade eficiente para fragmento alvo, com a atividade de clivagem colateral de Cas13a, o oligonucleotídeo na superfície do eletrodo foi degradado, produzindo mudanças significativas no sinal de corrente em medições através de VC e VPD. Os testes usando este biossensor podem ser realizados a uma temperatura constante (37°C), mostrando potencial para ser desenvolvido como testes em POC. Ao mesmo tempo que reduz o uso de termocicladores caros, o teste encurta o ciclo

de detecção para 60 minutos (30 minutos de RPA e 30 minutos de CRISPR) e pode fornecer uma plataforma simples e como boa reprodutibilidade para uso em laboratórios de base e detecção em campo. No entanto, o estudo presente apresentou algumas limitações importantes que precisam ser abordadas. Primeiro, o biossensor não foi testado quanto ao limite de detecção, limitando a importância dos resultados deste estudo. Em segundo lugar, o biossensor não foi validado em ambiente clínico. Portanto, estudos são necessários para validar e otimizar ainda mais o desempenho do dispositivo em diferentes condições e amostras. Em resumo, este biossensor eletroquímico baseado em CRISPR/Cas13a pode fornecer futuros testes de detecção molecular para diferentes alvos, o ajuste pode ser conseguido através da simples modificação da sequência variável do crRNA.

FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

- Abudayyeh O. O., Gootenberg J. S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I. M., et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, p. 353, n. 6299, p. aaf5573, 2016.
- Allan-Blitz L-T., Shah P., Adams G., Branda J. A., Klausner J. D. et al. Development of Cas13a-based assays for *Neisseria gonorrhoeae* detection and gyrase A determination. *mSphere*. v. 8, n. 5, p. e0041623, 2023.
- Almasi M. A., Erfan Manesh M., Jafary H., Dehabadi S. M. Visual detection of Potato Leafroll virus by loop-mediated isothermal amplification of DNA with the GeneFinder™ dye. *J Virol Methods*, v. 192, n. 1-2, p. 51-4, 2013.
- Angell D. H., Dickinson T. The kinetics of the ferrous/ferric and ferro/ferricyanide reactions at platinum and gold electrodes. *J. Electroanal. Chem*, v. 35, p. 55–72, 1972.
- Arroyo-Olarte R. D., Bravo Rodríguez R., Morales-Ríos E. Genome Editing in Bacteria: CRISPR-Cas and Beyond. *Microorganisms*, v. 15, n. 4, p. 844, 2021.

- Belluzo M. S., Ribone M. E., Lagier C. M. Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics. *Sensors (Basel)*, v. 8, n. 3, p. 1366-1399, 2008.
- Bonini A., Poma N., Vivaldi F., Biagini D., Bottai D., et al. A label-free impedance biosensing assay based on CRISPR/Cas12a collateral activity for bacterial DNA detection. *J Pharm Biomed Anal.*, v. 10, n. 204, p. 114268, 2021.
- Bruch R., Baaske J., Chatelle C., Meirich M., Madlener S., et al. CRISPR/Cas13a-Powered Electrochemical Microfluidic Biosensor for Nucleic Acid Amplification-Free miRNA Diagnostics. *Adv Mater.*, v. 31, n. 51, p. e1905311, 2019.
- Castillo-Henríquez L., Brenes-Acuña M., Castro-Rojas A., Cordero-Salmerón R., Lopretti-Correa M., et al. Biosensors for the Detection of Bacterial and Viral Clinical Pathogens. *Sensors (Basel)*, v. 4, n. 20, p. 6926, 2020.
- Ding X, Yin K, Li Z, Lalla RV, Ballesteros E, Sfeir MM, Liu C. Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay. *Nat Commun*, p. 11, n. 1, p. 4711, 2020.
- Duan L., Yang X., Zhan W., Tang Y., Wei M., et al. Development of a rapid and accurate CRISPR/Cas13-based diagnostic test for GII.4 norovirus infection. *Front Microbiol.*, v. 13, p. 912315, 2022.
- Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Lee J. W., Essletzbichler P., Dy A. J., et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, v. 356, n. 6336, p. 438-442, 2017.
- Hoa X. D., Kirk A. G., Tabrizian M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress. *Biosens Bioelectron.*, v. 23, n. 2, p. 151-60, 2007.
- Hong J. S., Son T., Castro C. M., Im H. CRISPR/Cas13a-Based MicroRNA Detection in Tumor-Derived Extracellular Vesicles. *Adv Sci (Weinh)*, p. 10, n. 24, p. e2301766, 2023.
- Huang X., Chen L., Xu J., Ji H. F., Zhu S., et al. Rapid visual detection of phytase gene in genetically modified maize using loop-mediated isothermal amplification method. *Food Chem*, v. 156, p. 184-9, 2014.
- Karthik K., Rathore R., Thomas P., Arun T. R., Viswas K. N., et al. New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX*, v. 1, p. 137-43, 2014.
- Kellner M. J., Koob J. G., Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Zhang F. SHERLOCK: detecção de ácido nucleico com nucleases CRISPR. *Protocolo Nat*, v. 14, n. 10, p. 2986-3012, 2019.
- Kozovska Z., Rajcaniova S., Munteanu P., Dzacovska S., Demkova L. CRISPR: History and perspectives to the future. *Biomed Pharmacother*, v. 141, p. 111917, 2021
- Li Z., Ding X., Yin K., Xu Z., Cooper K., et al. Electric field-enhanced electrochemical CRISPR biosensor for DNA detection. *Biosens Bioelectron*, v. 192, p. 113498, 2021.
- Liu J., Wan Q., Zeng R., Tang D. An ultrasensitive homogeneous electrochemical biosensor based on CRISPR-Cas12a. *Anal Methods*, v. 13, n. 29, p. 3227-3232, 2021.

- Mölsä M., Koskela K. A., Rönkkö E., Ikonen N., Ziegler T., et al. Detection of influenza A viruses with a portable real-time PCR instrument. *J Virol Methods*, v. 181, n. 2, p. 188-91, 2012.
- Mota D. S., Guimarães J. M., Gandarilla A. M. D., Filho J. C. B. S., Brito W. R., et al. Recombinase polymerase amplification in the molecular diagnosis of microbiological targets and its applications. *Can J Microbiol*, v. 68, n. 6, p. 383-402, 2022.
- Muzyka K. Current trends in the development of the electrochemiluminescent immunosensors. *Biosens Bioelectron*, v. 15, n. 54, p. 393-407, 2014.
- Newsham E., Richards-Kortum R. CRISPR-Based Electrochemical Sensor Permits Sensitive and Specific Viral Detection in Low-Resource Settings. *ACS Cent Sci.*, v. 7, n. 6, p. 926-928, 2021.
- Pramanik D., Shelake R. M., Kim M. J., Kim J. Y. CRISPR-Mediated Engineering across the Central Dogma in Plant Biology for Basic Research and Crop Improvement. *Mol Plant*, v. 14, n. 1, p. 127-150, 2021.
- Qian C., Wang R., Wu C., Wang L., Ye Z., et al. A fast and visual method for duplex shrimp pathogens detection with high specificity using rapid PCR and molecular beacon. *Anal Chim Acta*, v. 1040, p. 105-111, 2018.
- Southern S. J., Oyston P. C. F. Genome editing of *Francisella tularensis* using (CRISPR-Cas9). *J Microbiol Methods*, v. 176, p. 106004, 2020.
- Turner A. P. Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, v. 21, n. 8, p. 3184-96, 2013.
- Zhou T., Huang R., Huang M., Shen J., Shan Y., et al. CRISPR/Cas13a Powered Portable Electrochemiluminescence Chip for Ultrasensitive and Specific MiRNA Detection. *Adv Sci (Weinh)*, p. 7, n. 13, p. 1903661, 2020.

5 DISCUSSÃO GERAL

Sistemas de repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente inter-espaçadas (CRISPR) e proteínas associadas (Cas) têm sido cada vez mais usados para aplicações de diagnóstico clínico, devido à sua alta flexibilidade, especificidade e sensibilidade (Abudayyer et al., 2016). Gootenberg et al. estabeleceram um método molecular baseado no sistema CRISPR/Cas13a combinado com a tecnologia de amplificação isotérmica de RPA, tornando-se uma possibilidade promissora para plataforma de diagnóstico molecular. Neste estudo, os autores descobriram que a proteína Cas13a combinada ao crRNA pode detectar o RNA alvo por meio do emparelhamento de bases complementares, estimulando a ativação da atividade de RNase da Cas13a a causar a “clivagem colateral” que cliva de forma inespecífica RNAs não-alvos. O método demonstrou detectar com sensibilidade em nível attomolar e especificidade de base única (Gootenberg et al., 2017; Kellner et al., 2019).

Visto o potencial uso do sistema CRISPR/Cas13a para diagnóstico molecular, foram desenvolvidos no presente trabalho testes moleculares baseados no sistema CRISPR/Cas13a para detecção de *Plasmodium vivax*. No capítulo 1 foi apresentado um artigo de revisão acerca da técnica de RPA publicado na revista Canadian Journal of Microbiology em 2022. Buscou-se com esta revisão apresentar os aspectos gerais do RPA como técnica isotérmica, focando no uso da tecnologia combinada a métodos de detecção para o diagnóstico clínico em diferentes doenças infecciosas. Destacando-se, ainda, a sua utilização em diferentes aplicações, por exemplo, em estratégias para uso na agricultura, veterinária e no monitoramento da segurança alimentar. Além disso, o RPA demonstrou ser altamente sensível, permitindo a detecção de alvos moleculares em concentrações muito baixas. Isso o torna uma ferramenta promissora para aplicação em combinação com o sistema CRISPR/Cas para o diagnóstico de doenças infecciosas em POC.

No capítulo 2 foi apresentado um artigo com o objetivo de detectar *P. vivax* em amostras clínicas através do ensaio baseado no sistema CRISPR/Cas13a por fluorescência. Neste estudo, utilizou-se a amplificação por PCR combinado a capacidade do sistema CRISPR/Cas13a em reconhecer sequências específicas de ácidos nucleicos do *P. vivax* para gerar uma resposta fluorescente mensurável, indicando a presença do alvo. Uma das principais vantagens desse método desenvolvido foi a sua boa sensibilidade, permitindo a detecção em concentrações tão baixas quanto 1,35 pM. A sensibilidade do nosso ensaio de

detecção CRISPR/Cas13a por fluorescência revelou-se comparável a estudos previamente publicados sobre malária utilizando essa abordagem. Cunningham et al. relataram um limite de detecção de 31,3 aM para *P. vivax* por meio da amplificação por RPA combinada com detecção por CRISPR/Cas13a. Por outro lado, o estudo de Lee et al. demonstrou um desempenho de sensibilidade melhor, com um limite de detecção 50 zM para *P. vivax* utilizando o ensaio com CRISPR/Cas12a. Esse aumento na sensibilidade pode atribuído a vários fatores, como o uso de volume de amostra de entrada superior, inclusão de uma etapa de adicional de RT-RPA, a alta concentração de crRNA, dentre outros fatores. Apesar das diferenças de protocolos utilizados, os ensaios CRISPR/Cas publicados tem demonstrado detectar concentrações de parasitas significativamente abaixo do limite esperado para malária clínica (Cunningham et al., 2021; Lee et al., 2020).

Além disso, o teste buscou validar a sua aplicabilidade em amostras clínicas de pacientes infectados com *P. vivax*. Das 30 amostras positivas, 27 apresentaram resultados positivo com o método, demonstrando uma sensibilidade clínica considerável, pois o ensaio conseguiu identificar corretamente a maioria das amostras que realmente continham *P. vivax*. Das 20 amostras negativas analisadas, o método não detectou a presença de 19 delas, demonstrando uma especificidade aceitável. No entanto, alguns fatores devem ser analisados acerca das amostras testadas. Devido ao período prolongado de armazenamento combinado ao processo de descongelamento das amostras de DNA, pode ter contribuído para uma degradação do material, aumentando a incidência de resultados falsos negativos apresentados neste estudo. Independentemente disso, neste capítulo, o ensaio baseado em CRISPR/Cas13a projetado para detecção de amostras clínicas pode oferecer uma alternativa promissora aos métodos convencionais, permitindo uma detecção altamente específica para detecção da malária, embora sejam necessárias mais avaliações para uma melhor validação desse método.

No capítulo 3 foi apresentado o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico empregando o sistema CRISPR/Cas13a para detecção molecular de alvo específico. A abordagem central deste estudo consiste na imobilização de oligonucleotídeo na superfície de eletrodos SPCE/STV e uso de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sonda redox para estudar a resposta elétrica através de técnicas eletroquímicas. Uma série de ensaios foi conduzida com o intuito de otimizar a quantidade de oligonucleotídeo na superfície dos eletrodos, buscando assegurar a obtenção de melhor sinal-fundo por meio de análises por VDP. Após a incubação com

diferentes concentrações de oligo, a concentração de 2 μM apresentou a melhor relação de sinal-fundo, atuando como uma barreira para transferências de elétrons pela superfície do eletrodo de trabalho, causando diminuição nos sinais de correntes do VPD (Haji-Hashemi et al., 2019). Li et al. otimizaram a quantidade de oligonucleotídeo ssDNA-MB avaliando diferentes concentrações, variando de 1 a 10 μM , e compatível com os nossos resultados, os autores demonstraram que concentração de 2 μM apresentou a melhor relação sinal-fundo. Neste caso, os autores observaram que o aumento adicional da concentração de oligo reduziu a diferença de sinal de corrente, e isto foi atribuído a mais oligo se difundindo para a superfície do eletrodo, superando a repulsão eletrostática em altas concentrações de oligo (Li et al., 2021).

Para produção do biossensor para detecção de Cas13a, o desenho do oligonucleotídeo foi projetado em desoxirribonucleotídeo contendo ribonucleotídeo de citidina (rC) como local de clivagem para enzima (Sato & Shigeori, 2013). Os testes iniciais de funcionamento do biossensor utilizando RNase A, indicaram que o oligonucleotídeo foi projetado de maneira satisfatória, uma vez que a enzima clivou a sequência de ribonucleotídeo, resultando em mudanças mensuráveis nos sinais de correntes por VDP e VC. Quando o sistema CRISPR/Cas13a ativado pelo alvo foi depositado no eletrodo SPCE/STV/Oligo, ocorreu um aumento expressivo no valor de corrente, e esse aumento foi interpretado como resultado da clivagem do oligo, facilitando assim, a transferência de elétrons do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ no eletrodo. Por outro lado, na ausência de alvo, o perfil voltamétrico não obteve alteração, indicando que o oligo se manteve íntegro. Adicionalmente, o biossensor eletroquímico demonstrou boa reprodutibilidade nos experimentos realizados, sugerindo viabilidade para futuras aplicações em detecção molecular. No entanto, é importante ressaltar que essa pesquisa ainda está em estágio inicial e ensaios adicionais, como otimização da sensibilidade e especificidade do biossensor, devem ser acrescentados para validar e aprimorar esse teste.

Além dos estudos empregando a metodologia mostrada no capítulo 3, outros testes adicionais foram realizados inicialmente, mediante o uso do oligonucleotídeo marcado com ferroceno (Fc) para fabricação do biossensor (apresentado nos apêndices desta tese). O Fc é utilizado como mediador redox em biossensores devido às suas propriedades, é reversível e na sua forma reduzida é altamente solúvel, o que auxilia a difusão do ferroceno entre a enzima e o transdutor. No entanto, observamos que, embora o Fc produzisse sinalização eficiente nos testes iniciais de caracterização, a etiqueta não foi encontrada nos ensaios

subsequentes com CRISPR/Cas13a. Acredita-se que esse resultado tenha ocorrido devido a perda da monocamada de sinalização Fc do oligonucleotídeo, que pode ter sofrido oxidação e possui fraca estabilidade eletroquímica. Kang et al. relataram em seu estudo que sensores baseados em Fc são menos estáveis que sensores baseados em sonda marcada com azul de metileno no que diz respeito à estabilidade ao armazenamento a longo prazo, repetidos testes eletroquímicos e repetidas iterações de detecção/regeneração. Os autores observaram ainda que sensores fabricados usando um redox Fc exibiram uma perda de 91% de corrente de sinalização original após 180 horas de armazenamento em tampão (Kang et al., 2009).

Este trabalho evidencia algumas limitações que devem ser consideradas. Em primeiro lugar, é importante mencionar que a avaliação do desempenho do teste por fluorescência foi realizado com base em um conjunto restrito de amostras. Além disso, o teste eletroquímico carece de uma avaliação em ambiente clínico. Embora os resultados obtidos até o momento possam ser promissores, é fundamental realizar testes em larga escala com amostras clínicas para confirmar a eficácia e a precisão dos testes em ambientes clínicos. Portanto, é necessário reconhecer que as conclusões apresentadas neste trabalho podem ser limitadas devido ao tamanho reduzido da amostra e à falta de validação clínica abrangente. Mais estudos são imprescindíveis para estender a avaliação do desempenho clínico dos testes, incluindo a análises da especificidade com diferentes espécies de *Plasmodium*.

Em segundo lugar, a incorporação da etapa de transcrição T7 na reação CRISPR/Cas13a pode aumentar o custo final e a complexidade do ensaio, em comparação, por exemplo, com os ensaios do sistema CRISPR/Cas12a direcionado ao DNA. O aumento do custo e a complexidade pode representar desafios significativos para implementação prática dos testes, especialmente em contextos em que os recursos financeiros são limitados. Portanto, é importante considerar estratégias que possam mitigar essas questões, como a otimização de protocolos de transcrição T7 e uso de reagentes mais acessíveis. Além disso, pesquisas para o desenvolvimento de plataformas baseadas em sistemas CRISPR/Cas em nível nacional pode vir a resolver problemas com o pagamento de *royalties* para os detentores das patentes internacionais, facilitando assim, a comercialização no Brasil.

Finalmente, a implementação de plataformas de detecção baseadas em CRISPR envolve duas etapas distintas: amplificação (PCR ou RPA) e detecção pela Cas13a. Cada uma dessas etapas requer condições de reação específicas e diferentes conjuntos de componentes químicos. Essa distinção implica na necessidade de realizar múltiplas

operações manuais e abrir tubos de reação de amplificação, o que aumenta o risco de contaminação por transporte de amplicons. Algumas possibilidades podem ser adotadas para evitar tais contaminações, uma delas é a implementação de práticas laboratoriais, como áreas de trabalho laboratorial fisicamente separadas, nas quais são realizadas manipulações pré e pós-amplificação. Uma outra forma de reduzir significativamente a contaminação é utilização de dUTP em vez de dTTP na mistura principal da reação de amplificação e subsequente tratamento da reação com DNA uracila glicosilase (UDG) antes das amplificações. A UDG degrada amplicons contendo dUTP, evitando assim que estas moléculas sirvam como modelos para novas reações e consequentemente contaminação. Além disso, alguns estudos propuseram combinar amplificação isotérmica com os reagentes CRISPR em uma única etapa. Isto não apenas resolveria problemas como a contaminação por aerossol, mas simplificaria o protocolo de operação e reduziria o tempo de processamento (Hu et al., 2022; Wang et al., 2023; Yuan et al., 2022).

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho destacam o potencial da plataforma CRISPR/Cas13a como uma ferramenta de detecção promissora para contribuir significativamente para o controle e erradicação da malária. Os testes por fluorescência demonstraram uma sensibilidade e especificidade satisfatórias na identificação de *P. vivax*. Por sua vez, os testes eletroquímicos baseados em CRISPR/Cas13a ofereceram uma alternativa de detecção de ácidos nucleicos, apresentando um tempo de operação significativamente mais curto e simplificado comparado ao método tradicional de detecção molecular. Todo o processo de detecção pode ser facilmente realizado a 37°C em apenas 1 hora, o que sugere uma ferramenta promissora para testes de diagnóstico em POC.

6 CONCLUSÃO

Baseado nos dados apresentados neste trabalho, conclui-se que:

- Com base na revisão de literatura realizada, constata-se que o RPA representa uma tecnologia de amplificação isotérmica versátil, que pode ser empregada em uma variedade de aplicações e com diferentes vantagens, tornando-o altamente promissor para aplicação em POC, onde a rapidez, eficiência e portabilidade são essenciais;
- O teste de CRISPR/Cas13a por fluorescência demonstrou uma notável sensibilidade, detectando até mesmo 1,35 pM, corroborando com os dados já disponíveis na literatura sobre a detecção de *P. vivax* utilizando a tecnologia CRISPR/Cas. Além disso, o ensaio mostrou-se eficiente na detecção de amostras clínicas, destacando-se pela sua notável sensibilidade e especificidade na identificação específica de *P. vivax*;
- A fabricação do biossensor, constituído de oligonucleotídeo imobilizado em SPCE/STV, foi realizada com sucesso e funcionalizada de forma satisfatória para a identificação do alvo, exibindo um sinal significativo de corrente;
- O biossensor eletroquímico identificou de forma qualitativa a presença de alvo pelo sistema CRISPR/Cas13a, evidenciando padrão de resposta eletroquímica diferente na ausência de alvo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUDAYYEH, O. O. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. **Science (New York, N.Y.)**, v. 353, n. 6299, p. aaf5573, 2016.
- ABUDAYYEH, O. O. et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. **Nature**, v. 550, n. 7675, p. 280–284, 2017.
- ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The Biology of *Plasmodium vivax*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 9, 2017.
- ADAPA, S. R. et al. *Plasmodium vivax* readiness to transmit: implication for malaria eradication. **BMC systems biology**, v. 13, n. 1, p. 5, 2019.
- ALECRIM, M. D. G. C.; ALECRIM, W.; MACEDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 67–68, 1999.
- ALEMAYEHU S. et al. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. **Malaria Journal**. v. 8, n. 12, p. 277, 2013.
- ALEXANDRE, M. A. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 10, p. 1611–1614, 2010.
- ALLAN-BLITZ L-T. et al. Development of Cas13a-based assays for *Neisseria gonorrhoeae* detection and gyrase A determination. **mSphere**, v. 24, n. 8, p. e0041623, 2023.
- AMIR, A. et al. Diagnostic tools in childhood malaria *Parasites and Vectors*. **Parasites Vectors**, v. 11, p. 53, 2018.
- BAIRD, J. K. et al. Resistance to Chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 547–552, 1991.
- BAIRD, J. K. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2004.
- BARD AJ, FAULKNER LR. **Métodos Eletroquímicos: Fundamentos e Aplicações**. 2. John Wiley & Sons, Inc; Hoboken: 2001.
- BARTOLONI, A.; ZAMMARCHI, L. Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe

Malaria. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 201, 2012.

BAYAT, H. et al. The Impact of CRISPR-Cas System on Antiviral Therapy. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 4, p. 591, 2018.

BERLINER, R. W. et al. Studies on the chemotherapy of the human malarías; of the human malarías the physiological disposition, antimalarial activity, and toxicity of several derivatives of 4-aminoquinoline. **The Journal of clinical investigation**, v. 27, n. 3, p. 98–107, 1947.

BETUELA, I. et al. Relapses Contribute Significantly to the Risk of Plasmodium vivax Infection and Disease in Papua New Guinean Children 1–5 Years of Age. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 11, p. 1771–1780, 2012.

BILLKER, O. et al. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 289–292, 1998.

BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and Infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 377, 2011.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A., **Electroquímica. Princípios, Métodos e Aplicações**. New York: Oxford University Press Inc. 471, 1993.

BORÓK A, LABODA K, BONYÁR A. PDMS Bonding Technologies for Microfluidic Applications: A Review. **Biosensors (Basel)**. v. 23, n. 11, p. 292, 2021.

BROUNS, S. J. J. et al. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5891, p. 960, 2008.

CASTILLO-HENRIQUEZ, L. et al. Biosensors for the Detection of Bacterial and Viral Clinical Pathogens. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 6926, p. 1–26, 2020.

CESEWSKI, E.; JOHNSON, B. N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosens Bioelectron**, v. 159, p. 112214, 2020.

CHANDRASEKARAN S. S. et al. Rapid detection of SARS-CoV-2 RNA in saliva via Cas13. **Nature Biomedical Engineering**, v. 6, n. 8, p. 944-956, 2022.

- CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 6–7, p. 441–456, 2002.
- CHEHUAN, Y. F. et al. In vitro chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 226, 2013.
- CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29–45, 1962.
- CORDRAY, M. S.; RICHARDS-KORTUM, R. R. Emerging Nucleic Acid–Based Tests for Point-of-Care Detection of Malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 2, p. 223, Aug. 2012.
- CHENG L. et al. Tetrahedron supported CRISPR/Cas13a cleavage for electrochemical detection of circular RNA in bladder cancer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 222, p. 114982, 2023.
- CHU CS, WHITE NJ. The prevention and treatment of Plasmodium vivax malaria. **PLoS Med**. V. 18, n. 4, p. e1003561, Apr 2021.
- CUNNINGHAM C. H., et al. A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of Plasmodium detection, species differentiation, and drug-resistance genotyping. **EBioMedicine**, v. 68, p. 103415, 2021.
- D’ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 334, n. 1–2, p. 41–69, 2003.
- DAI, Y. et al. Exploring the Trans-Cleavage Activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the Development of a Universal Electrochemical Biosensor. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 58, n. 48, p. 17399–17405, 2019.
- DAYANANDA, K. K.; ACHUR, R. N.; GOWDA, D. C. Epidemiology, Drug Resistance, and Pathophysiology of Plasmodium vivax Malaria. **Journal of vector borne diseases**, v. 55, n. 1, p. 1, 2018.
- DUAN L. et al. Development of a rapid and accurate CRISPR/Cas13-based diagnostic test for GII.4 norovirus infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 24, n. 13, p. 912315, 2022.
- EAST-SELETSKY, A. et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. **Nature**, v. 538, n. 7624, p. 270–273, 2016.

FANG, A.; NG, H. T.; LI, S. F. Y. A high-performance glucose biosensor based on monomolecular layer of glucose oxidase covalently immobilised on indium-tin oxide surface. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 1, p. 43–49, 2003.

FERNÁNDEZ-BECERRA C. et al. Increased expression levels of the *pvcrt-o* and *pvm-dr1* genes in a patient with severe *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 2, n. 8, p. 55, 2009.

FERNANDO, O.; MAGNER, E. Biosensors—Recent Advances and Future Challenges in Electrode Materials. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 12, p. 1–17, 2020.

FREIJE, C. A. et al. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13. **Molecular cell**, v. 76, n. 5, p. 826, 2019.

GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax*: who cares? **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 9, 2008.

GONÇALVES, L. A.; CRAVO, P.; FERREIRA, M. U. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 534, 2014.

GOOTENBERG, J. S. et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 356, n. 6336, p. 438–442, 2017.

GUERRA, C. A.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 8, p. 353, 2006.

GUPTA, S. et al. Ultrasensitive transglutaminase based nanosensor for early detection of celiac disease in human. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 905–911, 2017.

GUPTA, V. K. et al. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals-A review. **Analytical Biochemistry**, v. 408, n. 2, p. 179–196, 2011.

HAJI-HASHEMI, H. Simple and effective label free electrochemical immunosensor for Fig mosaic virus detection. **Analytical Biochemistry**, v. 566, 2019,

HAJIAN, R. et al. Detection of unamplified target genes via CRISPR–Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. **Nature Biomedical Engineering**, v. 3, n. 6, p. 427–437, 2019.

HALEEM, A. et al. Biosensors applications in medical field: A brief review. **Sensors International**, v. 2, p. 100100, 2021.

HAN, Y. et al. Immunocapture Magnetic Beads Enhanced and Ultrasensitive CRISPR-Cas13a-Assisted Electrochemical Biosensor for Rapid Detection of SARS-CoV-2. **Biosensors (Basel)**, v. 13, n. 6, p. 597, 2023.

HÄNSCHEID, T.; GROBUSCH, M. P. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 395–398, 2002.

HAPPI CT et al. Selection of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 alleles in asexual stages and gametocytes by artemether-lumefantrine in Nigerian children with uncomplicated *falciparum* malaria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 3, p. 888-95, 2009.

HE, S. et al. Integration of Different Graphene Nanostructures with PDMS to Form Wearable Sensors. **Nanomaterials (Basel)**. v. 14, n.12, p. 950, 2022.

HOWES, R. E. et al. Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 418, 2013.

HU F. et al. A one-pot CRISPR/Cas13a-based contamination-free biosensor for low-cost and rapid nucleic acid diagnostics. **Biosens Bioelectron**, v. 15, n. 202, p. 113994, 2022.

HUANG, F. et al. Biosensors Coupled with Signal Amplification Technology for the Detection of Pathogenic Bacteria: A Review. **Biosensors**, v. 11, n. 6, 2021.

HUANG W. et al. Establishment and preliminary evaluation of a fluorescent recombinase-aided amplification/CRISPR-Cas12a system for rapid detection of *Plasmodium falciparum*. **Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi**, v. 13, n. 35, p. 38-43, 2023.

IBRAHEEM Z. O. et al. Role of Different *Pf*ert and *Pfmdr-1* Mutations in Conferring Resistance to Antimalaria Drugs in *Plasmodium falciparum*. **Malaria Research and Treatment**. v. 2014, p. 950424, 2014.

JACKSON, S. A. et al. CRISPR-Cas: Adapting to change. **Science**, v. 356, n. 6333, 2017.

JIA, F. et al. The expanded development and application of CRISPR system for sensitive nucleotide detection. **Protein & Cell**, v. 11, n. 9, p. 624, 2020.

KANG D. et al. Comparing the properties of electrochemical-based DNA sensors employing different redox tags. **Anal Chem.** v. 81, n. 21, p. 9109-13, 2009.

KARIUKI, S. N.; WILLIAMS, T. N. Human genetics and malaria resistance. **Human Genetics**, v. 139, n. 6, p. 801, 2020.

KELLNER, M. J. et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. **Nature Protocols**, v. 14, n. 10, p. 2986–3012, 2019.

KHARISMASARI C. Y. et al. CRISPR/Cas12-based electrochemical biosensors for clinical diagnostic and food monitoring, **Bioelectrochemistry**, v 155, p. 108600, 2024.

KOCHAR, D. K. et al. Plasmodium vivax Malaria. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 132, 2005.

KUMAR, P. et al. CRISPR-Cas System: An Approach With Potentials for COVID-19 Diagnosis and Therapeutics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.

LAND, K. J. et al. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. **Nature Microbiology** 2018 4:1, v. 4, n. 1, p. 46–54, 2018.

LEE R. A. et al. Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of *Plasmodium* species in symptomatic and asymptomatic malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 13, n. 117, p. 25722-25731, 2020.

LI, Z. et al. Electric field-enhanced electrochemical CRISPR biosensor for DNA detection. **Biosens Bioelectron**, v. 15, n. 192, p. 113498, 2021.

LIU, L. et al. The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a. **Cell**, v. 170, n. 4, p. 714- 726, 2017.

LOPES, L. C.; SANTOS, A.; BUENO, P. R. An outlook on electrochemical approaches for molecular diagnostics assays and discussions on the limitations of miniaturized technologies for point-of-care devices. **Sensors and Actuators Reports**, v. 4, p. 100087, 2022.

LOVER, A. A. et al. Malaria Elimination: Time to Target All Species. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 1, p. 17, 2018.

LUXEMBURGER, C. et al. The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 2, p. 105–111, 1996.

MA C. et al. CRISPR-empowered electrochemical biosensor for target amplification-free and sensitive detection of miRNA. **Talanta**. v. 1, n. 266, p. 125125, 2024.

MAKAROVA, K. S. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 722, 2015.

MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. The basic building blocks and evolution of CRISPR–Cas systems. **Biochemical Society transactions**, v. 41, n. 6, p. 1392, 2013.

MBANEFO, A.; KUMAR, N. Evaluation of Malaria Diagnostic Methods as a Key for Successful Control and Elimination Programs. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 2, 2020.

MEIBALAN, E.; MARTI, M. Biology of Malaria Transmission. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 3, 2017.

MELO, G. C. et al. Expression levels of pvcrt-o and pvmdr-1 are associated with chloroquine resistance and severe Plasmodium vivax malaria in patients of the Brazilian Amazon. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

MIKOLAJCZAK, S. A. et al. Plasmodium vivax liver stage development and hypnozoite persistence in human liver-chimeric mice. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 4, p. 526, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. DE V. EM S. Boletim Epidemiológico. 2021a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. DE V. EM S. Dia mundial de luta contra a malária. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 15, p. 1–27, 2021b.

MOSAWI, S. H. et al. An unlabelled probe-based real time PCR and modified semi-nested PCR as molecular tools for analysis of chloroquine resistant Plasmodium vivax isolates from Afghanistan. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 253, 2020.

MOTA, D. S. et al. CRISPR/Cas Class 2 systems and their applications in biotechnological processes. **Genetic Molecular Res.** v. 19, n. 1, p. GMR18478, 2020.

MOTA D. S. et al. Recombinase polymerase amplification in the molecular diagnosis of

microbiological targets and its applications. **Canadian Journal Microbiological**. v.22, p. 1-20. 2022.

MURPHY, S. C. et al. Malaria Diagnostics in Clinical Trials. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 5, p. 824, 2013.

MUSSET, L. et al. Emergence of plasmodium vivax resistance to chloroquine in French guiana. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 11, 2019.

NARESH, V.; LEE, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 4, p. 1–35, 2021.

NOMURA, T. et al. Evidence for Different Mechanisms of Chloroquine Resistance in 2 *Plasmodium* Species That Cause Human Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 11, p. 1653–1661, 2001.

OMS (2022). Relatório mundial sobre malária 2022 . Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240064898> .

ORIERO, E. C. et al. Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 2–13, 2015.

PERANDIN, F. et al. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, and Plasmodium ovale for Routine Clinical Diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1214–1219, 2004.

PÉREZ-FERNÁNDEZ, B.; COSTA-GARCÍA, A.; DE LA ESCOSURA- MUÑIZ, A. Electrochemical (Bio)Sensors for Pesticides Detection Using Screen-Printed Electrodes. **Biosensors**, v. 10, n. 4, 2020.

PERKINS, S. L. Malaria's many mates: Past, present, and future of the systematics of the order haemosporida. **Journal of Parasitology**, v. 100, n. 1, p. 11–25, 2014.

PHAM, N. M. et al. Malaria and the 'last' parasite: how can technology help? **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 260, 2018.

PHILLIPS, E. J.; KEYSTONE, J. S.; KAIN, K. C. Failure of Combined Chloroquine and High-Dose Primaquine Therapy for Plasmodium vivax Malaria Acquired in Guyana, South America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 1171–1173, 1996.

PHYO, A. P. et al. Dihydroartemisinin-piperaquine versus chloroquine in the treatment of Plasmodium vivax malaria in Thailand: a randomized controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**. v. 53, n 10, p. 977-984, 2011.

PLAGENS, A. et al. DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 3, p. 442, 2015.

PRATT-RICCIO, L. R. et al. Use of a colorimetric (DELI) test for the evaluation of chemoresistance of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax to commonly used anti-plasmodial drugs in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 281, 2013.

PRICE, R. N. et al. Vivax malaria: neglected and not benign. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 6 Suppl, p. 79, 2007.

PRIYA SWETHA, P. D. et al. Towards CRISPR powered electrochemical sensing for smart diagnostics. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 30, p. 100829, 2021.

REZAEI, B.; IRANNEJAD, N. Electrochemical detection techniques in biosensor applications. **Electrochemical Biosensors**, p. 11-43, 2019.

RIECKMANN, K. H.; DAVIS, D. R.; HUTTON, D. C. Plasmodium Vivax Resistance To Chloroquine? **The Lancet**, v. 334, n. 8673, p. 1183–1184, 1989.

RIJKEN, M. J. et al. Chloroquine resistant vivax malaria in a pregnant woman on the western border of Thailand. **Malaria Journal**, v. 10, p. 113, 2011.

RODULFO, H. et al. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 4, p. 535–543, 2007.

RUNGSIHIRUNRAT, K. et al. Plasmodium vivax Drug Resistance Genes; Pvmdr1 and Pvcrt-o Polymorphisms in Relation to Chloroquine Sensitivity from a Malaria Endemic Area of Thailand. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 1, p. 43, 2015.

SALES F. C., et al. Mechanical Characterization of PDMS with Different Mixing Ratios. **Procedia Structural Integrity**. v. 37, p. 383-388, 2022.

SATO, S. Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 40, n. 1, 2021.

SATO, S.; TAKENAKA S. Electrochemical RNase A Detection Using an Electrode with Immobilized Ferrocenyl Deoxyribooligonucleotide Containing Cytidine Residue. **Electroanalysis**, v. 25, n. 7, p. 1652 – 1658, 2013.

SHARMA, H.; MUTHARASAN, R. Review of biosensors for foodborne pathogens and toxins. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 183, p. 535–549, 2013.

SINGH, A. et al. Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. **Biosensors**, v. 11, n. 9, 2021.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J; WEST, D. M. **Fundamentos de Química Analítica: Tradução da 9ª Edição Norte-americana**. Cengage Learning, 2005.

SNOW, R. W. et al. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 214, 2005.

SOLAIMUTHU, A. et al. Nano-biosensors and their relevance in tissue engineering. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 13, p. 84–93, 2020.

SUWANARUSK, R. et al. Chloroquine Resistant *Plasmodium vivax*: In Vitro Characterisation and Association with Molecular Polymorphisms. **PLoS ONE**, v. 2, n. 10, p. 1089, 2007.

TANGPUKDEE, N. et al. Malaria diagnosis: a brief review. **The Korean journal of parasitology**. v. 47, n. 2, p. 93-102, 2009.

TAYLOR, W. R. J.; WHITE, N. J. Antimalarial Drug Toxicity: A Review. **Drug Safety**, v. 27, n. 1, p. 25–61, 2004.

THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1–2, p. 121–131, 2001.

TONY A et al. The Additive Manufacturing Approach to Polydimethylsiloxane (PDMS) Microfluidic Devices: Review and Future Directions. **Polymers (Basel)**. v. 18, n. 15, p. 1926, 2023.

VALLEJO, A. F. et al. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 48, 2016.

XIU L., et al. A versatile microfluidic platform for malaria infection screening and Plasmodium species genotyping. **EBioMedicine**, v. 98, p. 104898, 2023.

WANG J. **Eletroquímica Analítica**. 3. John Wiley & Sons, Inc; Hoboken: 2006.

WANG R. et al. Genetic Screens Identify Host Factors for SARS-CoV-2 and Common Cold Coronaviruses. **Cell**, v. 7, n. 184, p. 106-119, 2021.

WANG Y. et al. CESSAT: A chemical additive-enhanced single-step accurate CRISPR/Cas13 testing system for field-deployable ultrasensitive detection and genotyping of SARS-CoV-2 variants of concern. **Biosens Bioelectron**, v. 1, n. 229, p. 115238, 2023.

WEI H., et al. Rapid and Ultrasensitive Detection of *Plasmodium* spp. Parasites via the RPA-CRISPR/Cas12a Platform. **ACS Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 1534-1545, 2023.

WHITBY, M. et al. Chloroquine-Resistant Plasmodium Vivax. **The Lancet**, v. 334, n. 8676, p. 1395, 1989.

WHITE, N. J. et al. Chloroquine treatment of severe malaria in children. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 23, 1988.

WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. **Malaria Journal**, v. 10, p. 297, 2011.

WILSON, M. L. Malaria Rapid Diagnostic Tests. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 11, p. 1637–1641, 2012.

WILSON, M. S. Electrochemical immunosensors for the simultaneous detection of two tumor markers. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 1496–1502, 2005.

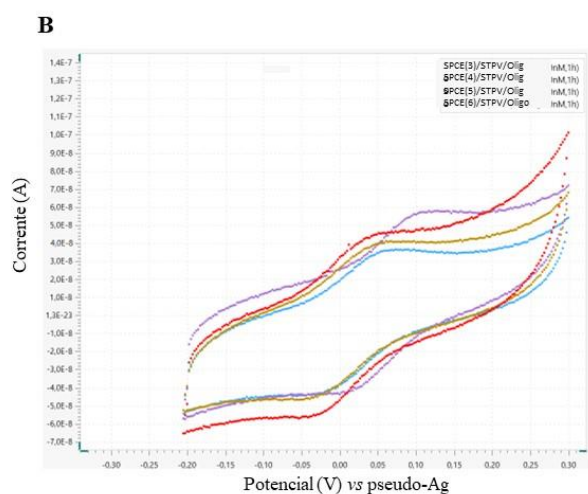
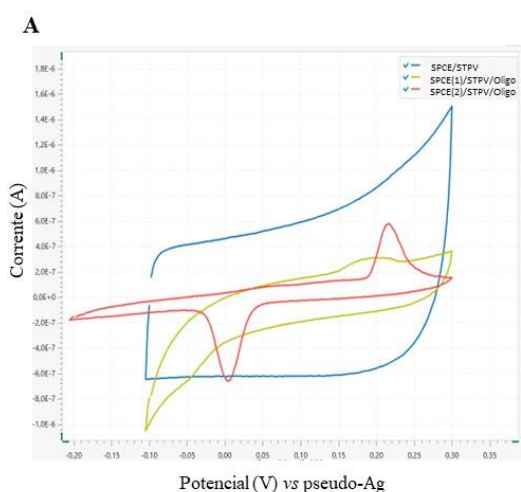
WU C. et al. CRISPR-powered microfluidic biosensor for preamplification-free detection of ochratoxin A. **Talanta**, v. 269, n. 125414, 2024.

WU L., et al. Ultrasensitive SARS-CoV-2 diagnosis by CRISPR-based screen-printed carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 1221, p. 340120, 2022.

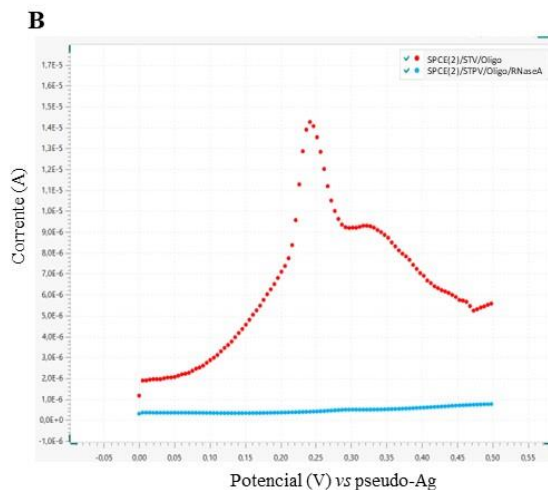
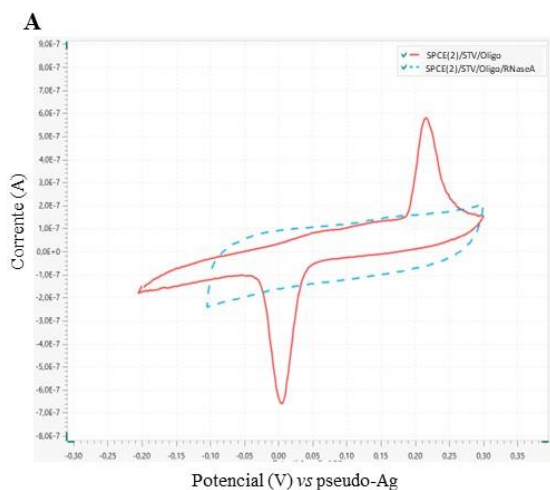
YANG J., et al. Engineered LwaCas13a with enhanced collateral activity for nucleic acid detection. **Nature Chemical Biology**, v. 19, p. 45–54, 2023.

ZHANG, D. et al. CRISPR/Cas12a-Mediated Interfacial Cleaving of Hairpin DNA Reporter for Electrochemical Nucleic Acid Sensing. **ACS Sensors**, v. 5, n. 2, p. 557–562, 2020.

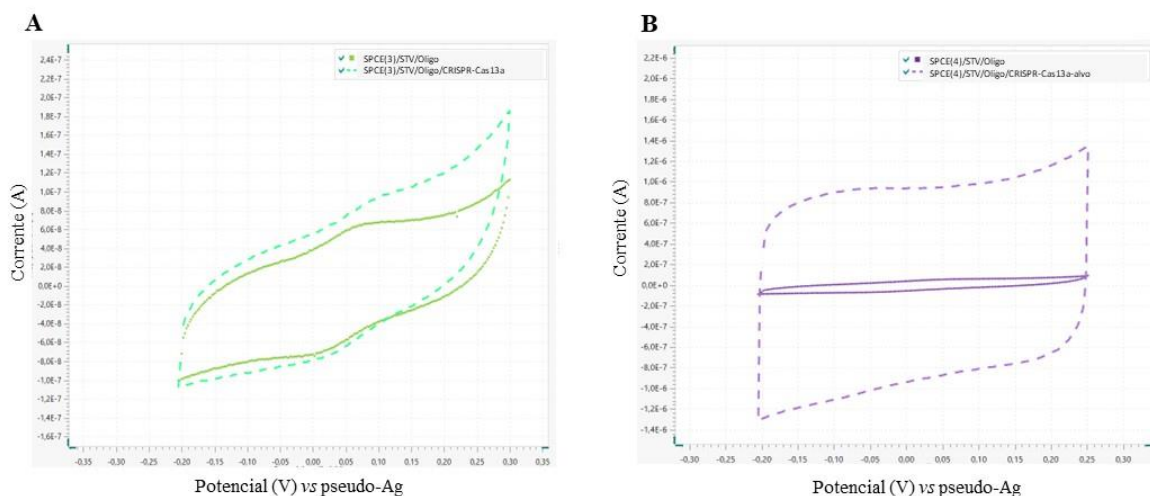
APÊNDICES



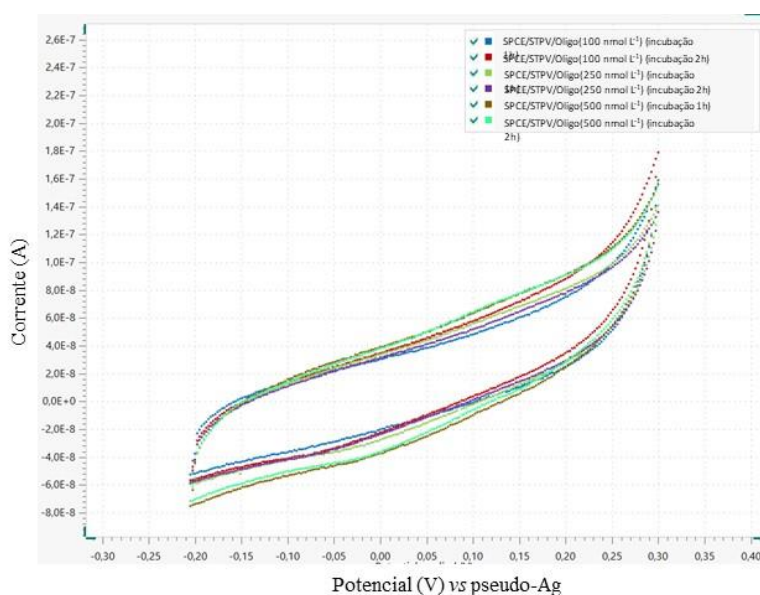
Apêndice 1: Curvas por VC da caracterização do biossensor eletroquímico com a sonda marcada com Fc. **A:** Dois SPCE/STV apresentando picos eletroquímicos bem característicos da imobilização da sonda. **B:** Quatro SPCE/STV apresentando sinais de correntes fracas após a imobilização da sonda.



Apêndice 2: Curvas por VC e VDP da funcionalização do biossensor eletroquímico com a sonda marcada com Fc após incubação com RNase A. **A:** VC apresentando diminuição do sinal de corrente após clivagem da sonda pela RNase. **B:** VDP apresentação diminuição da corrente eletroquímica. Ambos os gráficos apresentam boa funcionalização do biossensor com a sonda marcada com Fc.




Apêndice 3: Curvas por VC do biossensor eletroquímico após incubação com o sistema CRISPR/Cas13a. **A:** SPCE/STV/Oligo incubado com CRISPR/Cas13a na ausência de alvo. **B:** SPCE/STV/Oligo incubado com CRISPR/Cas13a incubado com o complexo CRISPR/Cas13a na presença de alvo, observa-se aumento considerável de sinal de corrente após interação da Cas13a com o biossensor, indicação clivagem da sonda.



Apêndice 4: Curvas por VC do biossensor eletroquímico após imobilização com várias concentrações de sonda. No entanto, observar-se que em todos os eletrodos submetidos o sinal de corrente não foi gerado, indicando uma provável perda da monocamada de sinalização Fc devido ao tempo prolongado de armazenamento da sonda.

ANEXO

Parecer consubstanciado do cep para amostras de soros humanos

<div><div>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL "DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO"</div><div></div></div>
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de métodos para diagnósticos de Malária..

Pesquisador: Luis André Morais Mariúba

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 28823719.4.1001.0005

Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

Patrocinador Principal: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

OSWALDO CRUZ

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPeAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.038.050

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação de métodos para diagnósticos de Malária".

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolvimento de novos métodos para diagnósticos de malária.

Objetivo Secundário:

• Avaliar a sensibilidade e especificidade de métodos para detecção da malária baseados na detecção de marcadores de infecção proteicos;•

Avaliar a sensibilidade e especificidade de métodos para detecção da malária baseados na identificação de material genético de Plasmodium extraído de amostras de pacientes

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide Parecer de nº 3.894.876 de 03 de março de 2020.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide Parecer de nº 3.894.876 de 03 de março de 2020.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25		
Bairro: D. Pedro I		
CEP: 69.040-000		
UF: AM	Município: MANAUS	
Telefone: (92)2127-9572	Fax: (92)2127-3572	E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 6.036.050

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Na primeira relatoria havia sido identificado as seguintes pendências: Anuências da DAM, Gerência de Malária e Gerência de Ambulatório.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As exigências do parecer consubstanciado foram atendidas. Sugiro aprovação do protocolo.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1474486.pdf	18/03/2020 13:15:35		Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Folharesposta.pdf	18/03/2020 13:15:01	Luís André Morais Mariúba	Acelto
Folha de Rosto	foihaderosto.pdf	13/12/2019 12:55:57	Luís André Morais Mariúba	Acelto
Outros	Questionario_epidemiologico.docx	11/12/2019 23:10:04	Luís André Morais Mariúba	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_n37_2019_Anuencia_Andre_FIO CRUZ.pdf	11/12/2019 23:08:54	Luís André Morais Mariúba	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIA_FUNDACAO_MEDICINA_TROPICAL.pdf	11/12/2019 23:07:40	Luís André Morais Mariúba	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsavel.docx	11/12/2019 23:07:14	Luís André Morais Mariúba	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO.docx	11/12/2019 23:00:18	Luís André Morais Mariúba	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO.docx	11/12/2019 22:59:33	Luís André Morais Mariúba	Acelto

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 89.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3672

Fax: (92)2127-3672

E-mail: cep@ftriam.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.036.050

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_avaliacao_de_metodos_para_di- agnosticos_de_malaria.docx	11/12/2019 22:57:45	Luiz André Moraes Marúba	Acelto
---	---	------------------------	-----------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

MANAUS, 20 de Maio de 2020

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3573 E-mail: cep@fmi.am.gov.br

Página 02 de 02