

PROPOSTA DE *HARDWARE* PARA UM PROTÓTIPO DE LEITOR PORTÁTIL DE FLUORESCÊNCIA EM ASSOCIAÇÃO À PCR ISOTÉRMICA PARA REALIZAR TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO MULTIPLEX DIRETO DO SARS-COV-2 E DO INFLUENZA A (H1N1)

Marcos Vinícius Sousa da Silva¹; Bruno Corrêa Arvan²; Cleber Vinicius Ribeiro de Almeida³; Valéria Loureiro da Silva⁴

¹ Graduado em Engenharia Elétrica; Bolsista INOVA-FIOCRUZ; marvin.sou@gmail.com

² Graduando em Engenharia Elétrica; Bolsista INOVA-FIOCRUZ; arvanbruno@gmail.com

³ Mestre em Engenharia Elétrica; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; cleber.vinicius@fiob.org.br

⁴ Doutora em Física; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; valeria.dasilva@fiob.org.br

RESUMO

Diante da epidemia da COVID-19, é fundamental a realização da testagem em massa, devido à fácil transmissão do SARS-COV-2. O principal método diagnóstico (RT-qPCR), não é compatível com isto, sendo uma técnica cara que requer equipamentos e profissionais especializados para sua aplicação. Este artigo tem como objetivo desenvolver um *hardware* para um protótipo de leitor portátil de fluorescência, associado à PCR isotérmica, para fornecer um teste preciso e mais rápido para diagnóstico multiplex direto do SARS-COV-2 e do Influenza A (H1N1).

PALAVRAS-CHAVE: COVID-19, Teste Rápido, Fluorescência, PCR Isotérmica.

1. INTRODUÇÃO

Diante da epidemia da COVID-19 é fundamental a realização da testagem em massa da população, devido à fácil transmissão do vírus SARS-COV-2. O principal método diagnóstico da presença de infecção pelo SARS-COV-2 consiste na reação em cadeia da polimerase associada a transcrição reversa do RNA viral, o RT-qPCR, que não é compatível com a testagem em massa da população, por se tratar de uma técnica cara e que requer equipamentos específicos e profissionais especializados para realizar a aplicação do teste.

Nesse contexto, existe a necessidade de desenvolvimento de novos testes que mantenham a elevada performance do RT-qPCR, mas que sejam compatíveis com testagem em massa da população. Uma das técnicas de PCR isotérmico, denominada RPA, é compatível com essas características e pode ser associada com uma transcrição reversa para a detecção de vírus contendo RNA.¹ Este artigo tem como objetivo desenvolver um *hardware* para um protótipo de leitor portátil de fluorescência, associado à PCR isotérmica, com o intuito de fornecer um teste mais rápido e simples para o diagnóstico multiplex do RNA do SARS-COV-2, juntamente com o diagnóstico diferencial do H1N1. Assim, será possível viabilizar a sua aplicação com maior facilidade em locais com baixos recursos e sendo compatível com a testagem em massa da população.

2. METODOLOGIA

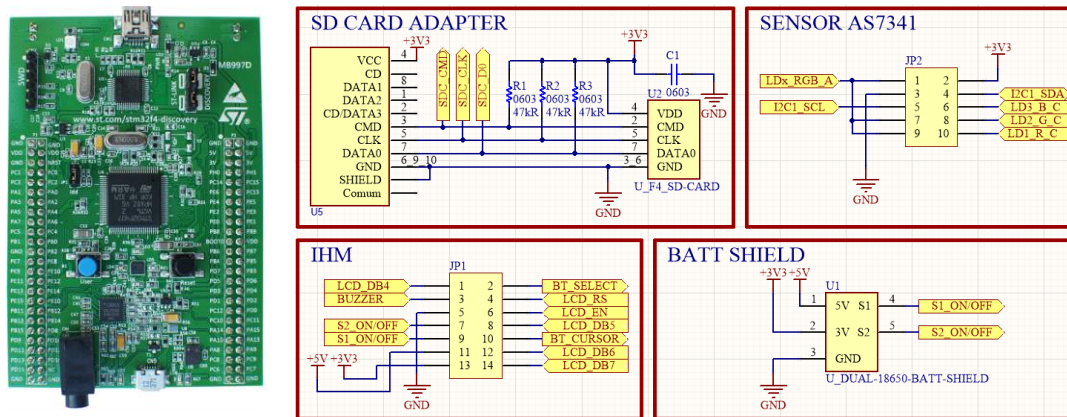
Para otimizar a construção inicial do *hardware* proposto, foram utilizados *kits* e módulos de desenvolvimento de mercado, de modo a desenvolver um protótipo para realizar a leitura e análise da fluorescência de uma amostra previamente tratada. Assim, as especificações e topologias de circuito utilizadas foram baseadas em três *kits* de desenvolvimento: módulo microcontrolado *STM32F4 Discovery*, fonte de tensão *Dual 18650 Battery Shield V8* e módulo sensor óptico multiespectral *AMS EVK AS7341*.

O *STM32F4 Discovery* (Figura 1(a)) é o módulo central do sistema, responsável por todo o gerenciamento e controle das ações relacionadas à leitura e análise das amostras submetidas ao medidor de fluorescência. Utilizando um microcontrolador de alta performance da família STM32F407 como núcleo de processamento, possui arquitetura *ARM® Cortex®-M4* 32-bit, com 1-Mbyte de memória *Flash* e 192-Kbyte de memória RAM.² O módulo dispõe ainda de conversor analógico/digital (ADC) de 10-bit, entradas e saídas digitais e analógicas, além de outros periféricos (temporizador, saída PWM, etc.), podendo ser eletricamente alimentado a partir do barramento USB VBUS ou através de uma fonte externa de 5V_{DC}. Este módulo compõe a base da placa de controle, que agrega os circuitos e conectores que propiciam a interligação entre as portas de entrada e saída do microcontrolador e os periféricos utilizados no protótipo (*display* LCD, *buzzer*, interface com cartão de memória micro-SD, etc.), bem como entre as placas projetadas. Conforme pode ser visto na Figura 1(b), essas conexões são feitas através dos conectores JP1, que se liga à placa da IHM, e do conector JP2, que acopla o módulo *AMS EVK AS7341* e os LEDs de excitação da unidade óptica.

Como o barramento VBUS da *Discovery* possui fornecimento de corrente limitado a 100mA para dispositivos externos ao módulo, optou-se por realizar a alimentação do protótipo a partir da fonte externa

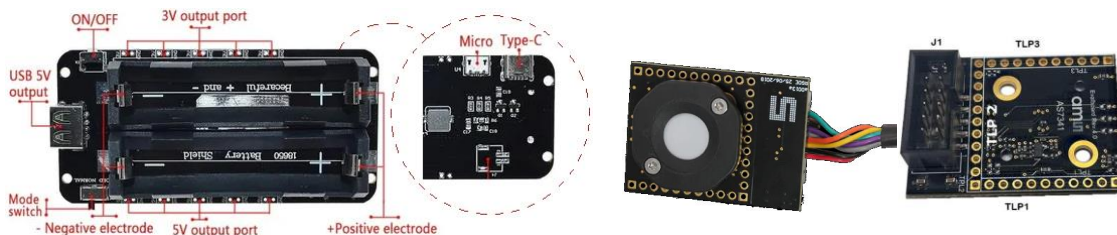
Dual ESP32 18650 Battery Shield V8 (Figura 2(a)), que utiliza duas baterias de Li-Ion padrão 18650 recarregáveis de 4,2V para prover duas tensões de saída: 5V_{DC} e 3V_{DC}, com capacidade de corrente de até 2A,³ suficiente para alimentar o módulo e demais periféricos utilizados no projeto.

Figura 1 – Módulo *STM32F4 Discovery* (a) e Circuitos Auxiliares da Placa de Controle (b)



Fonte: STMicroelectronics (2021) e Autor.

Figura 2 – Módulo de alimentação *Battery Shield* (a) e kit *AMS EVK AS7341* (b)



Fonte: Adaptado de DIY (2021) e AMS (2021).

O módulo possui um botão *pushbutton* com função liga/desliga (ON/OFF), que inicia o fornecimento de tensão ao ser pressionado levemente e o desliga quando mantido pressionado por cerca de 2 segundos. Quando ligado, as tensões de saída podem ser acessadas pelo conector USB tipo A, que disponibiliza a tensão padrão de 5V_{DC}, bem como a partir de contatos localizados nas bordas laterais da placa, dando acesso também à tensão de 3V_{DC}. Há ainda na placa um gerenciador de carga de bateria com dois conectores USB de entrada (micro-USB e tipo C), usados para realizar a recarga das baterias do módulo através de uma fonte externa de 6~8V_{DC}/1A.

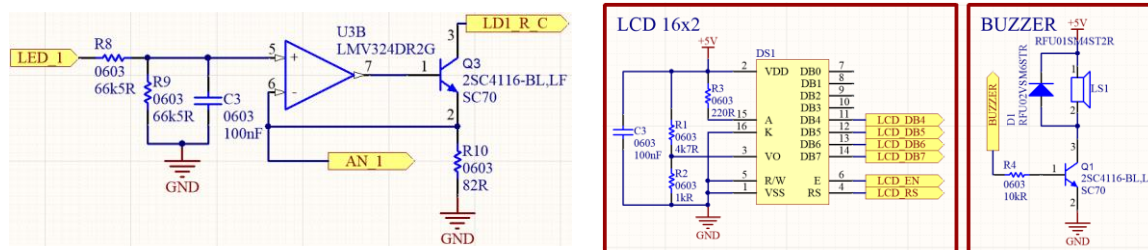
Já o *kit AMS EVK AS7341* (Figura 2(b)) é uma plataforma usada para avaliar as aplicações do sensor multiespectral de 11 canais AMS AS7341 e demonstrar diferentes casos de uso com base na detecção espectral, realizando desde funções básicas, como a detecção de intensidade luminosa, bem como funções especiais para aplicações específicas, como detecção de luz ambiente, modo de reflexão, detecção de cintilação e comparação de máscara espectral e de cor.⁴ A placa eletrônica do *kit* possui circuitos de comunicação (barramento I²C) e condicionamento do sensor, além de um difusor acoplado à sua lente, provendo todas as interfaces necessárias para o seu funcionamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram escolhidos três LEDs com luz incidindo em diferentes comprimentos de onda para realizar a excitação das amostras e observar o surgimento da fluorescência, de acordo com os fluoróforos definidos para detecção de cada genoma (viral ou de controle). Para permitir que cada LED pudesse ser calibrado de modo a maximizar o sinal de fluorescência, foram utilizados três circuitos como o da Figura 3(a), que realizam a conversão tensão-corrente para acionar cada LED com a corrente ótima. A tensão utilizada no conversor é

provida por uma saída PWM do microcontrolador (LED_1) e filtrada por um circuito RC, para que se tenha uma tensão proporcional ao ciclo de trabalho da saída PWM. A corrente de cada LED pode ser inferida a partir da leitura da tensão do resistor shunt (R10), realizada pelo microcontrolador através de uma entrada analógica (AN_1). O sistema de controle é realimentado para manter o nível do brilho dos LEDs constante através do uso do pixel "CLEAR" do sensor AS7341, que identifica a luminosidade emitida pelo LED, possibilitando ao microcontrolador aumentar ou diminuir o ciclo de trabalho da saída PWM para se ter mais ou menos corrente excitando o LED, haja vista que sua luminosidade é diretamente proporcional à sua corrente de excitação.

Figura 3 – Circuito de controle e acionamento dos LEDs de excitação (a) e parte dos periféricos da IHM (b)



Fonte: Autor.

Já na placa da Interface Homem-Máquina (IHM) encontram-se os circuitos e componentes utilizados para realizar a interação física entre o usuário do protótipo e o sistema. A placa possui três botões de comando do hardware, além de um *display* LCD 16x2 e um *buzzer* (Figura 3(b)). O botão ON/OFF, conectado diretamente no módulo *Battery Shield* é usado para ligar e desligar o protótipo; já os botões SELECT e CURSOR, são conectados à placa de controle e ligados às entradas digitais da *Discovery* para comandar as ações do protótipo durante o seu funcionamento. No *display* LCD são exibidas todas as mensagens de configuração e ações, como mensagens de erro, orientações para cadastro e calibração de novas amostras padrão, além de resultados das amostras analisadas, por exemplo.

Por fim, a partir dos módulos, *kits* e circuitos apresentados, foram projetadas as duas placas de circuito impresso do protótipo, estando tais placas interligadas por conectores e cabos de ligação do tipo *flat*.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após os testes finais dos circuitos e placas propostos, a próxima etapa do projeto será realizar as calibrações do sistema e validação do seu funcionamento e eficiência no diagnóstico multiplex do SARS-COV-2 e H1N1, através da formação de um banco de dados de amostras analisadas com o protótipo e sua posterior comparação com um equipamento de referência, possibilitando assim a sua utilização na testagem em massa da população e contribuindo para o enfrentamento da pandemia da COVID-19.

Agradecimentos

Agradecimentos ao SENAI CIMATEC e a FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) pelo apoio financeiro e tecnológico no desenvolvimento do projeto.

5. REFERÊNCIAS

- 1 PATEL, P. et al. **A Field-Deployable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of the Chikungunya Virus**. PLoS neglected tropical diseases, v. 10, n.9, p.e4953, set. 2016.
- 2 STMicroelectronics. **Discovery kit with STM32F407VG MCU**. Disponível em: < <https://www.st.com/en/evaluation-tools/stm32f4discovery.html>>. Acesso em: 31 mar. 2021.
- 3 DIY. **18650 Battery Shield V8 Mobile**. Disponível em: < <https://www.diy-more.cc/collections/expansion-shield-module/products/18650-16340-lithium-battery-shield-v9-v8-v3-mobile-power-expansion-board-module-5v-3a-3v-micro-usb-type-c-for-arduino-esp8266>>. Acesso em: 31 mar. 2021.
- 4 AMS. **Spectral Sensor Eval Kit**. Disponível em: < <https://ams.com/as7341-11-channel-spectral-sensor-eval-kit>>. Acesso em: 31 mar. 2021.