

Deborah Cristina Teixeira Alves

**Diagnóstico salivar do Enterovírus 71 por meio de
espectroscopia ATR-FTIR acoplada a algoritmos de
inteligência artificial**

*Salivary diagnosis of Enterovirus 71 using ATR-FTIR spectroscopy
coupled with artificial intelligence algorithms*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Odontologia na Área de
Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2024

Deborah Cristina Teixeira Alves

Diagnóstico salivar do Enterovírus 71 por meio de espectroscopia ATR-FTIR acoplada a algoritmos de inteligência artificial

Salivary diagnosis of Enterovirus 71 using ATR-FTIR spectroscopy coupled with artificial intelligence algorithms

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino-Silva

Co-orientador: Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Robinson Sabino-Silva

Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Suplentes:

Profa. Dra. Ana Paula Turrioni Hidalgo

Profa. Dra. Renata Pereira Georjutti

Uberlândia, 2024

- A474d
2024
- Alves, Deborah Cristina Teixeira, 1993-
Diagnóstico salivar do Enterovírus 71 por meio de espectroscopia ATR-FTIR acoplada a algoritmos de inteligência artificial [recurso eletrônico] = Salivary diagnosis of Enterovirus 71 using ATR-FTIR spectroscopy coupled with artificial intelligence algorithms / Deborah Cristina Teixeira Alves. - 2024.
- Orientador: Robinson Sabino-Silva.
Coorientadora: Ana Carolina Gomes Jardim.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Odontologia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.5016>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.
1. Odontologia. I. Sabino-Silva, Robinson, 1981-, (Orient.). II. Jardim, Ana Carolina Gomes, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314

André Carlos Francisco
Bibliotecário Documentalista - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
 Av. Pará, 1720, Bloco 4L, Anexo B, Sala 35 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8115/8108 - www.pgoufu.com - copod@umuarama.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Odontologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado, nº 442, PPGODONTO				
Data:	Trinta e Um de Janeiro de Dois Mil e Vinte e Quatro	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:45
Matrícula do Discente:	121220D0011				
Nome do Discente:	Deborah Cristina Teixeira Alves				
Título do Trabalho:	Diagnóstico salivar do Enterovirus 71 por meio de espectroscopia ATR-FTIR acoplada a algoritmos de inteligência artificial				
Área de concentração:	Clínica Odontológica Integrada				
Linha de pesquisa:	Patologia e Diagnóstico Bucal				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Patologia e Diagnóstico Bucal				

Reuniu-se em Web Conferência pela plataforma Zoom, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia, assim composta: Professores Doutores: Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira (UFU); Julliane Maria Guerreiro Tanomaru (UNESP); Robinson Sabino da Silva (UFU); orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Robinson Sabino da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/01/2024, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/01/2024, às 18:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, Usuário Externo**, em 31/01/2024, às 19:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5139656** e o código CRC **23277694**.

DEDICATÓRIA

Dedico meu mestrado aos meus pais, Tereza e Cleber, que jamais mediram esforços e recursos para que eu pudesse estar aqui hoje. São meu alicerce, minha base e meu conforto, onde encontro amor e acolhimento em qualquer hora e qualquer lugar.

Aos meus irmãos, Raphael e Giovanni, que fazem minha vida ser infinitamente mais feliz, menos solitária e indiscutivelmente mais divertida. São os maiores presentes que Deus me deu.

Ao meu namorado, Leandro, quem compartilhou parte dessa jornada comigo. Meu porto seguro, meu melhor amigo e meu maior incentivador. A surpresa mais grata do meu mestrado.

À Fernanda, Mirlany, Sttephany, Anna Giulia, Karen, Tércia, Calebe e Carola, meus amigos do coração que caminharam comigo nesse processo, foram meus ouvintes, confidentes e fizeram minha jornada infinitamente mais feliz.

À minha pequena grande família, composta pelos meus tios Gracinha e Jairo, e pelos meus primos Eduardo, Hugo, Bernardo, Juliane, Carol, Heloísa e Laura. Mesmo distantes, sempre se mostram presentes e com toda certeza foram fundamentais para que eu chegasse tão longe.

A Deus, por suas mãos sempre presentes na minha vida. Me guiando, me guardando, me cuidando e me dando forças. Por jamais me abandonar, quando eu mesma já havia me abandonado. Por me mostrar que o caminho que o Senhor escolheu é sempre melhor. Por derramar suas bênçãos sobre minha família e as pessoas que amo. Nunca estive sozinha, o Senhor sempre esteve comigo.

Em especial, em memória do meu tio José Eustáquio de Moura, quem eu jamais imaginei que agora estaria nos braços do Senhor. Meu tio foi poeta, sem jamais ter publicado seus inúmeros poemas e livros. Foi o maior sábio que já conheci, sem nunca ter feito faculdade. E era amor por onde passava. Ainda é amor. Sua falta jamais deixará de ser sentida aqui. E para sempre será lembrado pelo seu sorriso largo e por ser o melhor ouvinte que já conheci. Descanse em paz, tio.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Robinson Sabino-Silva pela oportunidade de ter sido orientada por um profissional tão exemplar. Seu conhecimento, orientação e apoio ao longo da minha trajetória foram fundamentais para meu desenvolvimento acadêmico e profissional. Agradeço por sua paciência, sua disponibilidade, seu constante incentivo e seu comprometimento com seus orientandos. Foi um enorme privilégio ser orientada por um profissional tão excepcionalmente dedicado à ciência e com tamanha compaixão como ser-humano. Obrigada por confiar em mim esse trabalho que sinto tanto orgulho!

Agradeço à Faculdade de Odontologia e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de formação profissional e acadêmica em uma instituição de ensino de tamanha importância e qualidade. Agradeço por todo o suporte oferecido pelos professores e pela secretaria, que foram fundamentais para minha formação e produção acadêmica. E por toda a estrutura oferecida, que proporcionam um ambiente enriquecedor de aprendizado e construção de conhecimento científico.

Agradeço aos meus colegas do Grupo de Pesquisa e Inovação em Diagnóstico Salivar e Nanobiotecnologia (SALIVANANO) por todo o auxílio durante minha trajetória. Obrigada por compartilharem seus conhecimentos e por contribuírem ativamente para meu desenvolvimento como pesquisadora. Sinto muito orgulho em fazer parte de um grupo tão competente e com profissionais tão dedicados e qualificados.

Agradeço ao LAPAV, em especial ao Igor Andrade e à Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim por contribuírem com a minha pesquisa e por sempre se disponibilizarem a trabalhar em conjunto com nosso grupo. Com toda certeza, essa contribuição é essencial e enriquecedora para nossas produções acadêmicas.

Expresso minha gratidão aos voluntários da minha pesquisa, que tornaram esse trabalho possível.

Por fim, gostaria de agradecer à CAPES, CNPq e FAPEMIG por todo o suporte financeiro para a pesquisa e pela minha bolsa de estudos, que foram fundamentais para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido.

*Todos os homens têm uma história para contar
Todos os homens têm uma ferida e uma flor
No seu padecimento
Todos têm uma lâmpada e uma sombra
Ardendo e obscurecendo caminhos
Cegando ou ampliando os espinhos
Todos os homens têm uma história para contar
Uma esfera rodopiando dentro da cabeça
Todos os homens são mestres e leigos
Aprendendo e desaprendendo verdadeiramente a amar
Uma coragem e uma covardia a contagiar
Todos os homens têm uma história para contar
Todos os homens têm um olhar triste e
Uma explosão de esperança
Todos têm a imensidão do universo
E a pequenez do verme
Uma complacente adesão ao mundo que os
Admira e esquece
Todos os homens têm uma história para contar*

José Eustáquio de Moura

SUMÁRIO

RESUMO/PALAVRAS-CHAVE	11
ABSTRACT/KEYWORDS	13
1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	15
2. CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1	30
REFERÊNCIAS	55

RESUMO

A infecção pelo Enterovírus 71 (EV71) está associada à diversas doenças, entre as mais comuns se encontram a doença mão-pé-boca (DMPB) e a herpangina. Essas doenças são, normalmente, autolimitantes e causam sintomas leves. Entretanto, devido ao neurotropismo do vírus, podem ocorrer algumas complicações graves como meningite asséptica, paralisia flácida aguda e meningoencefalite. As doenças relacionadas ao EV71 acometem adultos, adolescentes e crianças. Surtos da DMPB causados pelo EV71 frequentemente ocorrem em todo o mundo, especialmente na região do Pacífico-Ásia. Os atuais métodos diagnósticos para a detecção viral do EV71 incluem o isolamento viral, reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) e teste de neutralização. Porém, são técnicas demoradas, com reagentes tóxicos, de alto custo e que requerem primers específicos e treinamento especializado. Apesar de presente na orofaringe, estudos sobre a utilização da saliva como fluido diagnóstico para o EV71 são escassos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a acurácia de uma técnica sustentável, rápida e custo-efetiva baseada na Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR) para detectar o EV71 em diferentes diluições de saliva humana. A saliva foi coletada de 10 indivíduos saudáveis e cada amostra foi submetida a uma diluição seriada em dez vezes com EV71 partindo da concentração de 1×10^7 unidades formadoras de partícula por mililitro (UFP/mL). O conjunto de dados consistiu em 90 amostras de saliva infectada ou não infectada. Para saliva infectada foram realizadas 10 análises de cada diluição: 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10 e 1 UFP/mL totalizando 80 amostras de saliva infectada. Uma alíquota não-infectada de cada paciente foi separada e utilizada como controle, totalizando 10 salivas não-infectadas controle. O ATR-FTIR acoplado a quatro diferentes algoritmos de inteligência artificial (Adaptative Boosting, Artificial Neural Networks, Random Forest, e Support Vector Machine) foi utilizado para detectar o EV71 diluído nas 8 diferentes concentrações. O algoritmo que obteve melhores resultados foi o Adaptative Boosting (AdaBoost) com acurácia de 70%, sensibilidade de 70% e especificidade de até 80% na concentração de 1×10^7 UFP/mL. Esse estudo de

prova de conceito demonstrou o potencial do ATR-FTIR como uma plataforma livre de reagentes, sustentável e que necessita de um volume ultra-baixo de saliva para detecção do EV71 em concentrações maiores que 1×10^7 UFP/mL.

Palavras-chave: Enterovirus 71 humano, Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier, saliva.

ABSTRACT

Enterovirus 71 (EV71) infection is associated with various diseases, with hand, foot, and mouth disease (HFMD) and herpangina being among the most common. These diseases are typically self-limiting and cause mild symptoms. However, due to the virus's neurotropism, severe complications can occur, such as aseptic meningitis, acute flaccid paralysis, and meningoencephalitis. EV71-related illnesses affect adults, adolescents, and children. HFMD outbreaks caused by EV71 often occur worldwide, especially in the Asia-Pacific region. Current diagnostic methods for EV71 viral detection include viral isolation, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and neutralization testing. However, these techniques are time-consuming, involve toxic reagents, are costly, and require specific primers and specialized training. Despite the virus being present in the oropharynx, studies on using saliva as a diagnostic fluid for EV71 are limited. In this context, this study aimed to investigate the accuracy of a sustainable, rapid, and cost-effective technique based on Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) to detect EV71 in different dilutions of human saliva. Saliva was collected from 10 healthy individuals, and each sample underwent tenfold serial dilution with EV71 starting from a concentration of 1×10^7 plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). The dataset comprised 90 samples of infected or non-infected saliva. For infected saliva, 10 analyses were performed for each dilution: 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10 e 1 PFU/mL, totaling 80 samples of infected saliva. A separate aliquot from each sample was set aside and used as a control, totaling 10 control saliva samples. ATR-FTIR coupled with four different artificial intelligence algorithms (Adaptive Boosting, Artificial Neural Networks, Random Forest, and Support Vector Machine) was used to detect EV71 diluted at eight different concentrations. The Adaptive Boosting (AdaBoost) algorithm achieved the best results with an accuracy of 70%, sensitivity of 70%, and specificity of up to 80% at a concentration of 1×10^7 PFU/mL. This proof-of-concept study demonstrated the potential of ATR-FTIR as a reagent-free, sustainable platform requiring an ultra-low saliva volume for detecting EV71 at concentrations greater than 1×10^7 PFU/mL.

Keywords: Enterovirus 71, Human; Fourier Transform Infrared Spectroscopy; saliva.

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Enterovirus 71 (EV71)

O Enterovírus 71 é um vírus de RNA, pertencente ao gênero *Enterovirus* e à família *Picornaviridae*¹⁻³. Foi primeiramente isolado nos Estados Unidos e identificado por Schmidt et al. (1974) como o vírus causador de doenças com acometimento do sistema nervoso central (SNC) que ocorreram entre 1969 e 1973 na Califórnia⁴. Sua partícula é não-envelopada, simétrica, com genoma de RNA positivo de fita simples e possui capsídeo icosaédrico de 20-30 nm^{3,5}. O capsídeo do EV71 possui 60 protômeros idênticos, cada um contendo 4 proteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4 (figura 1). Além das proteínas estruturais, o EV71 possui, também, 7 proteínas não-estruturais: 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D^{3,5}.

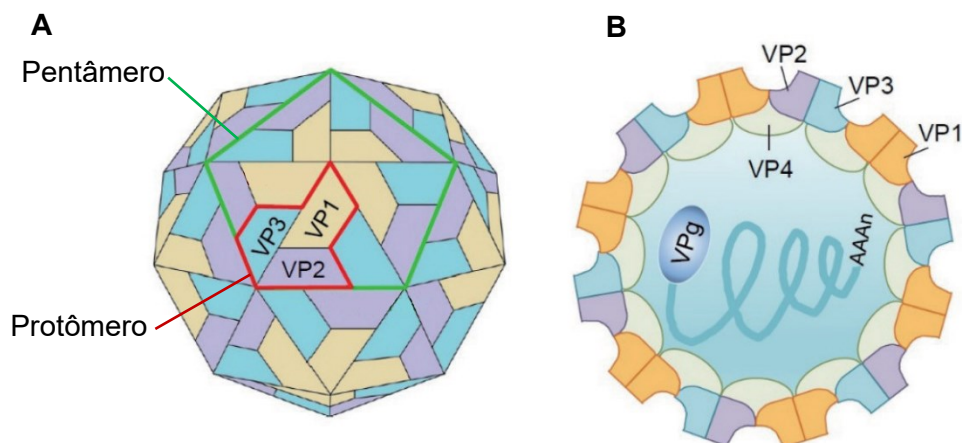


Figura 1. Estrutura do EV71. As proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, juntas, formam uma unidade denominada protômero. O conjunto de cinco protômeros forma um pentâmero que, juntamente com outros pentâmeros, configura o capsídeo viral (A). VP1, VP2 e VP3 se encontram na parte externa do virion, enquanto VP4 está na parte interna (B). Imagem modificada de: Yi, Shin, Kim J., Kim T., Chang (2017).

A proteína estrutural VP1 é composta por 297 aminoácidos e se destaca por conter epítomos de ligação aos receptores de células humanas, principalmente os receptores PSGL-1, presente em células imunológicas como linfócitos, e SCARB2, expresso em inúmeros tipos celulares, incluindo neurônios, e é responsável pela infecção do EV71 no SNC. A proteína VP1 está

relacionada ao neurotropismo e virulência do EV71^{5,6,7}. A VP2 contém 254 aminoácidos e possui inúmeros epítomos de neutralização. A VP3 consiste em 245 aminoácidos e possui epítomo conformacional que a difere de outros enterovírus e torna a VP3 um possível alvo para diagnóstico diferencial. A proteína VP4 contém 69 aminoácidos e, diferentemente das proteínas estruturais anteriores, é expressa na região interna do virion e confere estabilidade ao capsídeo, além de também conter epítomos de neutralização⁵.

Após a ligação do EV71 ao receptor de membrana da célula hospedeira, mudanças estruturais na cápsula viral ocorrem para que o RNA do vírus seja liberado no citoplasma da célula hospedeira. Por ser positivo, o RNA atua diretamente como RNA mensageiro. Apesar do EV71 não possuir o cap 5' no genoma viral, o início da tradução ocorre por meio do sítio interno de entrada do ribossomo presente na região 5'UTR (do inglês: *untranslated region*), que forma uma única poliproteína que é clivada por proteases para formar as quatro proteínas estruturais e as sete proteínas não-estruturais do EV71, que participam de sua replicação viral. A protease 2A do vírus interrompe a síntese proteica da célula hospedeira, enquanto a síntese de proteínas virais permanece inalterada. A lise da célula hospedeira ocorre após a liberação da partícula viral formada^{8,9}.

1.2 Doenças relacionadas à infecção pelo EV71

A infecção pelo EV71 está associada, mais comumente, a doenças como herpangina e doença mão-pé-boca (DMPB), que são, normalmente, autolimitantes e geram sintomas leves. Entretanto, devido ao seu alto neurotropismo, o EV71 pode causar complicações graves, como meningite asséptica, encefalite, meningoencefalite, paralisia flácida aguda e sepse neonatal, que podem ser fatais ou causarem sequelas significativas. Estima-se que aproximadamente 10-20% das infecções pelo EV71 evoluem para acometimento do sistema nervoso central^{1,3,8,10,11,24}.

Dentre as doenças geradas pela infecção pelo EV71, a DMPB se destaca por acometer, principalmente, crianças menores de 5 anos e por gerar surtos frequentes e relevantes em todo o mundo, especialmente na região do Pacífico-Ásia. É caracterizada por apresentar sintomas como perda de apetite, lesões ulcerativas em boca e erupções ou bolhas nas mãos, pés e região íntima,

que duram de 1-2 semanas e somem espontaneamente (figura 2)^{1,6,8,10,11}. A herpangina também afeta principalmente crianças, porém apresenta sintomatologia caracterizada por exantemas vesiculares na garganta e palato mole, acompanhados por febre, dor de garganta e dor ao engolir. O sorotipo mais comumente relacionado à herpangina é o Coxsackievirus A6^{17,18}. Assim como a herpangina, a DMPB pode ser causada por outros vírus do gênero *Enterovirus*, como o sorotipo Coxsackievirus A16, por exemplo. Entretanto, o EV71 possui relevância por ser o sorotipo mais prevalente em inúmeros surtos e por sua predominância em casos graves ou fatais da DMPB^{6,11-13}. Apesar de afetar crianças, em sua maioria, a DMPB também pode acometer adultos e adolescentes. Foram reportados casos de adultos imunocompetentes diagnosticados com a DMPB entre 2008 e 2013 na China, em sua maioria causados pelo EV71 e que apresentavam sintomas leves. No entanto, a pesquisa destacou que os adultos contribuíam para a transmissão ao negligenciarem a doença por apresentarem sintomas leves e, em muitos casos, assintomáticos¹⁴. Apesar de incomuns, casos fatais e com acometimento neurológico grave em adultos e adolescentes causados pela infecção pelo EV71 já foram registrados na literatura^{15,16,21}.

O período de incubação do EV71 após a infecção é curto e varia entre 2-7 dias. A replicação viral inicial ocorre no intestino delgado, na cavidade orofaríngea (amígdalas) e, 24 horas depois, nos gânglios linfáticos cervicais profundos e mesentéricos. A viremia ocorre após 72 horas e a infecção pode evoluir das seguintes formas: controle da infecção, sem apresentação de sintomas; lesões orais como único sinal; disseminação para a mucosa oral, mãos e pés, que resultam na apresentação dos sinais e sintomas típicos da DMPB; disseminação adicional para coração, baço, fígado, pulmão, pele, sistema nervoso central, dentre outros, concomitantemente com o início das características clínicas, que podem levar a complicações mais graves. No sétimo dia observa-se o aumento no nível de anticorpos, marcando o início da resolução da infecção^{8,19}. Fatores de risco para a evolução grave da DMPB incluem: febre com duração maior que 3 dias, temperatura corporal acima de 37,5 °C, vômitos, letargia, hiperglicemia e aumento do número de neutrófilos²⁰.

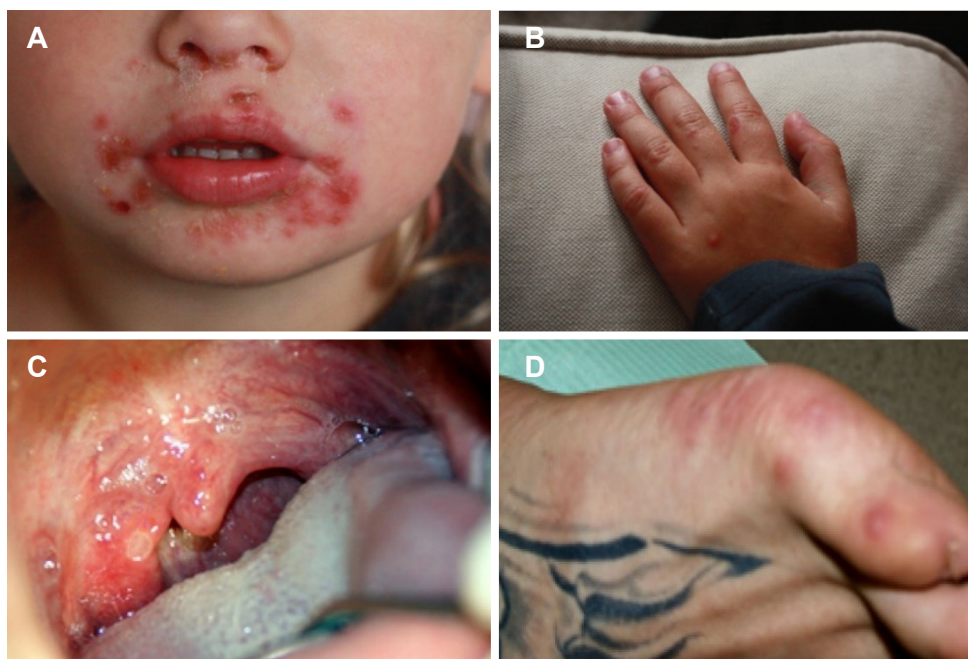


Figura 2. Apresentação clínica da doença mão-pé-boca em criança (A e B) e adulto (C e D). Erupções maculovesiculares na região perioral (A), erupções maculopapulares em mão (B), lesões ulcerativas em mucosa oral (C) e erupções maculopapulares em pé (D). Imagens modificadas de: Ślebioda, Dorocka-Bobkowska (2018) e Omaña-Cepeda et. al. (2016).

1.3 Epidemiologia da infecção pelo EV71

Muitos surtos da doença mão-pé-boca associada à infecção pelo EV71 têm sido relatados mundialmente desde os anos 70. Em 1973, no Japão, o vírus foi reconhecido pela primeira vez como o agente causador de uma epidemia da DMPB^{6,23}. Apesar de o EV71 estar presente na maioria dos países, sua detecção apresenta maior prevalência na região do sudeste asiático e do Pacífico ocidental, onde diversos países como Vietnã, Singapura, Taiwan, Malásia e China sofrem com surtos cíclicos e frequentes da infecção desde o início do século XXI. De maio de 2008 a junho de 2014, foram registrados 10.717.283 casos de doença mão-pé-boca (DMPB) na China, resultando em 3.046 óbitos. Dentre os casos fatais, 84,02% correspondiam a crianças com menos de 2 anos de idade^{6,10,23-25}. Em 2009, também na China, o EV71, representou 41% dos casos confirmados da DMPB em laboratório, porém foi o

sorotipo mais prevalente nos casos graves (81%) e fatais (93%)²⁴. Todavia, apesar da região Ásia-Pacífico reconhecidamente possuir o maior número de casos da DMPB mundialmente, infecções pelo EV71 têm sido reportadas em todo o mundo, como nos Estados Unidos, México, Austrália, Peru, Brasil e países da Europa e África, o que torna a DMPB e suas complicações um problema de saúde pública mundial (figura 3)^{6,23,25,31-36}.

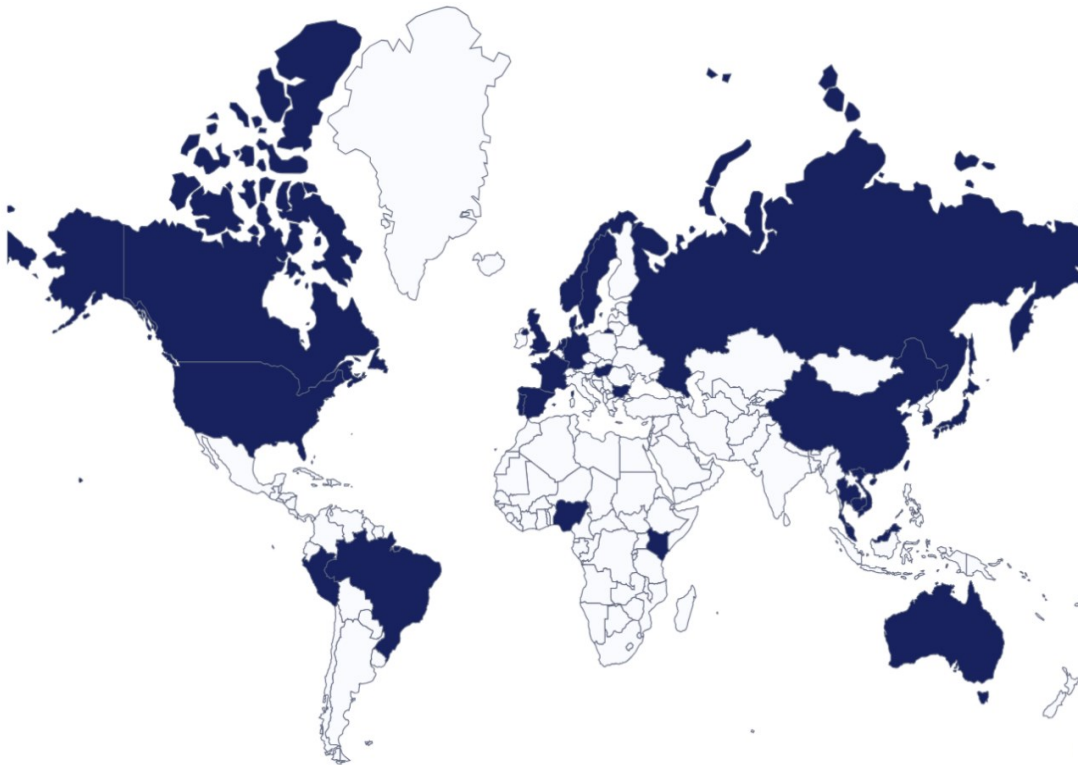


Figura 3. Países com casos reportados de infecção pelo EV71 em todo o mundo.

Além do padrão geográfico anteriormente mencionado, a infecção pelo EV71 possui, também, um padrão sazonal. Países de clima tropical possuem surtos da infecção durante todo o ano, enquanto há uma predominância de epidemias durante o verão e o outono em países de clima temperado^{10,25,26}. Existem várias teorias que buscam explicar o padrão sazonal da infecção pelo EV71. Essas teorias sugerem que variações na competência imunológica do hospedeiro, causadas por fatores sazonais como os níveis de melatonina ou vitamina D, podem desempenhar um papel importante. Além disso, fatores comportamentais sazonais, como a frequência escolar e a aglomeração em ambientes fechados, também podem influenciar a propagação do vírus e, por fim, fatores ambientais, como temperatura e umidade relativa, são considerados possíveis impulsionadores da infecção²⁶.

A DMPB causada pelo EV71 acomete, principalmente, crianças do sexo masculino. Estudos mostraram maior prevalência no sexo masculino durante o surto da doença na China entre 2008-2009²⁷, em Shanghai entre 2007-2010^{28,29} e em Taiwan entre 2000-2012^{30,37}. O estudo de Yin et. al. (2014) em adultos com a DMPB observou uma prevalência levemente maior entre as mulheres (59,2%). Esse dado pode ser atribuído ao maior contato das pacientes do estudo com crianças, o que, por sua vez, aumenta o risco de contágio. Esse cenário é evidenciado pelo fato de que 41,4% das mulheres diagnosticadas com a DMPB eram professoras ou faziam parte de equipe médica¹⁴. A prevalência de herpangina e de outras doenças causadas pelo EV71 é pouco conhecida devido a falta de protocolos de diagnóstico implementados.

1.4 Transmissão do EV71

Os humanos são os únicos hospedeiros naturais do EV71^{37,38}. A transmissão do EV71 ocorre através do contato com saliva, secreções respiratórias, fluidos presentes nas lesões cutâneas e fezes de pessoas infectadas. As vias de transmissão são fecal-oral, oral-oral, contato com gotículas respiratórias contendo o vírus ou através de fômites^{3,12,13,23,24}. A alta transmissibilidade do EV71 está ligada à prolongada sobrevivência ambiental desses vírus, que podem persistir por mais de 24 horas em superfícies metálicas e são resistentes à etanol 70%, éter e pH ácido^{37,38}. O intervalo de transmissão do vírus varia entre 1-15 dias³⁷. Foi demonstrado que os enterovírus podem ser detectados em garganta entre 1-2 semanas após a infecção e nas fezes por até 11 semanas³⁹. Apesar do EV71 permanecer por mais tempo nas fezes, sua carga viral é, aparentemente, maior na orofaringe. Pesquisas mostraram níveis maiores de isolamento do EV71 em swab de garganta (90%) comparados à swab retal e de fezes (32%)⁴⁰. Hábitos de higiene precários, saneamento ineficaz e aglomeração de crianças em creches e escolas podem atuar como fatores de aumento da transmissibilidade do EV71³⁸. A transmissão fecal-oral, em locais com níveis precários de higiene e saneamento, pode contribuir para surtos endêmicos na comunidade local, enquanto a transmissão via orofaringe e trato

respiratório, que possui maior carga viral, apesar de ter duração menor que as fezes, contribui para uma maior disseminação viral que pode culminar em epidemias do EV71 e, conseqüentemente, da DMPB/herpangina e suas complicações^{37,38}.

Além da aglomeração em creches e escolas, a transmissão familiar e entre indivíduos que coabitam a mesma casa é importante. Um estudo coorte prospectivo que analisou a transmissão familiar do EV71 em Taiwan encontrou os seguintes níveis de contágio entre parentes: 84% para irmãos, 83% para primos, 41% para os pais, 28% para avós e 26% para tios. A transmissão para os pais foi maior que para outros adultos, o que indica que o contato mais próximo e mais prolongado com indivíduos infectados facilita a transmissão do vírus. Não ocorreu diferença significativa entre pais e mães nessa pesquisa e foi possível concluir que as taxas de transmissão e a gravidade da infecção aumentam conforme a idade do infectado diminui, o que corrobora com o fato de que a doença afeta, principalmente, crianças. Uma explicação possível para esse fato é que a maioria dos adultos e crianças mais velhas já possuem anticorpos contra o EV71 ou vírus similares, ao contrário de crianças mais jovens que podem estar sujeitas à infecção primária. Outro fator a considerar é a higiene inadequada em crianças mais novas, que pode aumentar o risco de contato com uma carga viral mais elevada do EV71 e, dessa forma, resultar em casos mais graves da infecção³⁷.

Algumas medidas podem ser tomadas para prevenção da transmissão do vírus. Hábitos de higiene, como lavar as mãos, contribuem para uma menor transmissibilidade do EV71 pela via fecal-oral, entretanto são pouco eficazes para prevenção do contágio via gotículas de saliva e fômites. Para isso, é recomendado o isolamento do infectado, uso de máscaras e evitar convívio social entre 1-2 semanas após o contágio⁴¹.

1.5 Tratamento e vacina para o EV71

Apesar dos consideráveis esforços direcionados ao desenvolvimento de medicamentos antivirais por meio de diferentes abordagens, nenhuma terapia

antiviral específica para o EV71 está disponível atualmente para uso clínico e o tratamento é baseado no controle dos sintomas e manutenção da hidratação e nutrição adequadas do infectado^{3,10,42-44}. Estudos sobre possíveis alvos terapêuticos anti-EV71 mostram que a infecção pelo vírus pode ser combatida em diferentes etapas de seu ciclo de vida, como adsorção, penetração, síntese de moléculas biológicas e replicação. Estratégias variadas têm sido empregadas para desenvolver medicamentos antivirais. Na fase de ligação do vírus às células, o fator plaquetário 4 (PF4) e heparina atuam como potentes inibidores. Durante a penetração do RNA viral no citoplasma, inibidores das proteínas 2Apro e 3Cpro foram identificados como alvos terapêuticos para impedir a replicação do EV71. Além disso, diversos produtos naturais e seus análogos mostraram atividade farmacológica na inibição do vírus, destacando-se como potenciais candidatos antivirais^{42,44-50}.

Todavia, o método mais eficaz para o controle das doenças relacionadas ao EV71 é a vacinação. Entre 2015 e 2016, 3 vacinas de EV71 inativado criadas pela Sinovac, Vigoo e Academia Chinesa de Ciências Médicas (ACCM) foram aprovadas pela Administração de Alimentos e Medicamentos da China para uso comercial e têm sido aplicadas no país desde então, com público-alvo focado em crianças de 6 meses a 5 anos de vida. Outras duas em desenvolvimento em Taiwan e Singapura estão em fase de testes em humanos (tabela 1)^{42, 51-54, 59,60}. Uma significativa diminuição da morbidade e gravidade das infecções pelo EV71 pôde ser observada no país desde o início da vacinação da população, entretanto, os casos de DMPB causados por outros enterovírus aumentaram⁵¹. A eficácia da vacinação foi avaliada em estudo de fase IV com 155.995 crianças entre 6 meses e 6 anos de vida, onde 40.724 indivíduos receberam duas doses da vacina com EV71 inativado em um intervalo de 1 mês e as crianças restantes foram designadas como grupo controle. A pesquisa demonstrou eficácia de 89,7% na proteção contra a infecção pelo EV71⁵⁵. Entretanto, essas vacinas não foram aprovadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), bem como outros órgãos regulamentadores mundialmente, devido ao grau limitado de proteção à genogrupos do EV71, à necessidade de padronização da medição de respostas imunes à vacina e a existência de partículas completas e vazias do vírus na mesma vacina, que diferem em suas propriedades imunogênicas e antigênicas^{53,61}.

Tabela 1. Vacinas avaliadas em estudos clínicos. Tabela modificada de: Bello, Roshorn (2022).

Fabricante	Imugenicidade/eficácia	Esquema vacinal	Tamanho amostral	Atual status	Referência relevante
Beijing Vigoo (China)	90,0% (DMPB causada pelo EV71) e 80,4% (doenças associadas ao EV71)	Duas doses, com intervalo de 28 dias	10.077	Fase III concluída Licença para produção emitida	56
Sinovac (China)	94,8% (DMPB causada pelo EV71) e 88,0% (doenças associadas ao EV71)	Duas doses, com intervalo de 28 dias	10.245	Fase III concluída Licença para produção emitida	57
ACCM (China)	97,4% (DMPB causada pelo EV71)	Duas doses, com intervalo de 4 semanas	12.000	Fase III concluída Licença para produção emitida	58
INPS (Taiwan)	Seroproteção variou de 93,8-100,0% após 2 anos	Duas doses, com intervalo de 28 dias ou 56 dias	363	Fase II completa Fase III em andamento	59
Takeda vaccines (Singapura)	Induz anticorpos neutralizantes	Duas doses, com intervalo de 28 dias	36	Fase I completa	60

INPS: Instituto Nacional de Pesquisa em Saúde

1.6 Diagnóstico do EV71

O diagnóstico da infecção pelo EV71 pode ser baseado em manifestações clínicas da doença, quando o paciente apresentar sinais e sintomas típicos; histórico epidemiológico e contato com pessoas infectadas, considerando possíveis surtos e epidemias da DMPB que esporadicamente ocorrem, principalmente em creches e escolas; e investigação laboratorial do

vírus para confirmação da infecção⁴³. As amostras para investigação laboratorial incluem swabs de garganta, reto e úlceras, além de coleta de soro, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR)⁶². Os principais métodos laboratoriais para confirmação diagnóstica são baseados na cultura de células, isolamento do vírus e identificação do agente etiológico.

O isolamento viral, atualmente o método padrão-ouro para detecção do EV71, pode ser realizado em vários tipos celulares humanos e não-humanos, entretanto os mais utilizadas para EV71 são as células RB (células de rabdomiossarcoma humano) e Vero (células de rim do macaco verde africano), devido à sensibilidade dessas células ao efeito citopático aparente do vírus^{23,63}. Após o isolamento do EV71, alguns testes de identificação podem ser realizados, dentre eles: teste de neutralização; reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), utilizando diversas sequências gênicas do RNA viral como alvo; RT-PCR específico para EV71 que utiliza primer específico para o vírus, e teste de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais anti-EV71. Testes que não necessitam de isolamento viral e utilizam diretamente a amostra coletada também podem ser realizados, como o nested RT-PCR e PCR em tempo real. Outros métodos diagnósticos alternativos para EV71 têm sido testados, como a detecção de anticorpos IgM anti-EV71 pelo método ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), espectroscopia Raman aprimorada por superfície (SERS) associada à agregação induzida por proteína de nanoestrelas de ouro coloidal para detecção do EV71, entre outros^{23,64,65}. Todavia, as técnicas laboratoriais atualmente utilizadas possuem algumas desvantagens, que incluem: demora para obtenção dos resultados, risco de contaminação cruzada, descarte de resíduos tóxicos, altos custos operacionais, primers específicos, treinamento especializado para técnicos de laboratório e dificuldade de acesso à materiais necessários por algumas regiões^{23,64}.

A eficácia da detecção viral está relacionada ao sítio de coleta da amostra, à técnica laboratorial utilizada e à gravidade e tempo de curso da doença. O estudo de Ooi et. al. (2007), que utilizou RT-PCR em diferentes amostras de sítios estéreis (sangue, líquido cefalorraquidiano e líquido vesicular) e não-estéreis (swab de garganta, úlceras bucais e reto) encontrou maior

sensibilidade de detecção em swabs de garganta (49%), líquido vesicular (48%) e identificou que a combinação de ambos os sítios obteve os melhores resultados, com 67% de eficácia de detecção⁶³. Entretanto, o estudo de Zhou et. al. (2023) indicou que o RT-PCR e ELISA utilizando amostras de sítios estéreis (sangue e líquido cefalorraquidiano) e não-estéreis (swab de garganta/reto e fezes) obtiveram como resultado maior sensibilidade de detecção nas amostras de fezes (88%) comparada ao swab de garganta (80%) em RT-PCR. Não ocorreu diferença significativa entre as amostras de fezes e swab retal. Para sítios estéreis, o teste ELISA obteve melhores resultados que o RT-PCR (sangue: 62% vs. 2%; LCR: 47% vs. 0%). Também foi demonstrado que a maior gravidade da infecção, aliada ao menor intervalo entre o início da doença e a coleta das amostras contribuem para uma melhor detecção viral⁶⁶.

1.6 Saliva como fluido diagnóstico

A saliva é secretada através de 3 glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) e inúmeras glândulas salivares menores. As glândulas salivares são compostas por ácinos, responsáveis pela produção da saliva, e ductos, que modificam e conduzem a saliva até a boca. A água, proveniente do sangue, ultrapassa as células acinares através das zonas de oclusão e atinge o lúmen do ducto. A saliva inicial, portanto, é isotônica ao plasma sanguíneo e sua composição é modificada pelas células que compõem o ducto até sua liberação na cavidade oral. Diversas proteínas sintetizadas pelas glândulas salivares são expressas na saliva, dentre elas: mucinas, histatinas, cistatinas, amilases, estaterinas e proteínas ricas em prolina⁶⁷. A saliva expressa inúmeros eletrólitos, peptídeos, enzimas, hormônios, ácidos nucleicos, citocinas, anticorpos e outros componentes. Além das biomoléculas produzidas pelas células das glândulas salivares, esse biofluido também contém componentes séricos que são transportados dos capilares sanguíneos para as glândulas salivares. Embora sejam expressos em concentrações menores que o plasma sanguíneo, possuem potencial de utilização como biomarcadores circulantes relacionados a doenças^{68, 69}.

As proteínas, mRNA e metabólitos presentes na saliva podem ser aplicados para o desenvolvimento de novas plataformas de diagnóstico, pois suas variações podem refletir diversas doenças orais e sistêmicas. Análises para detecção de possíveis biomarcadores salivares podem ser realizadas através de diversas técnicas, como genômica, transcriptômica, proteômica, sensores eletroquímicos e espectroscopias^{65,70}. Inúmeros estudos encontraram biomarcadores salivares para as mais diversas doenças, como câncer de boca⁷¹, cárie dental⁷², Síndrome de Sjögren⁷³ e Alzheimer⁷⁴, por exemplo. Até o presente momento, apenas dois estudos avaliaram possíveis biomarcadores salivares do EV71. Na pesquisa de Min et. al. (2018), o miRNA circulante hsa-miR-221 destacou-se como possível biomarcador salivar do vírus e obteve uma eficácia de 77-92% na detecção do EV71⁷⁵. Já o estudo de Tan et. al. (2023) identificou 19 proteínas aumentadas e 51 proteínas diminuídas na infecção pelo EV71 e destacou a legumaina como potencial biomarcador salivar⁷⁶.

A saliva possui inúmeras vantagens como fluido diagnóstico. Sua coleta é não-invasiva, indolor, possui baixo custo, fácil transporte e é mais facilmente aceita por pacientes se comparada a métodos invasivos, como a coleta sanguínea, tornando-a ideal para estudos epidemiológicos em larga escala, além de rastreio e diagnóstico de diversas doenças⁷⁷. Apesar de a orofaringe ser um dos principais sítios de replicação do EV71 e da ampla utilização do swab de garganta para sua detecção, existe uma escassez de pesquisas envolvendo a saliva como fluido diagnóstico para esse vírus.

1.6 Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR)

A espectroscopia ATR-FTIR é uma técnica baseada na emissão de luz policromática que atinge a amostra presente no cristal do aparelho e mensura a quantidade de luz absorvida por ela (figura 4). A combinação de diferentes comprimentos de onda é convertida em um espectro através de uma equação matemática denominada de “transformada de Fourier”⁷⁸. A reflectância total atenuada (ATR) é uma técnica utilizada juntamente com a espectroscopia infravermelha e permite uma melhora na obtenção dos resultados obtidos pelo

FTIR por aumentar sua sensibilidade de detecção e reduzir o volume amostral necessário para ser lido no aparelho⁷⁹. Ao interagir com a amostra, o infravermelho gera vibrações das suas ligações moleculares, que são detectadas pela plataforma de FTIR. Considerando que cada amostra possui moléculas e composições únicas e suas assinaturas espectrais são igualmente singulares, o ATR-FTIR pode registrar a “impressão digital” bioquímica do objeto em estudo, na forma de um espectro único que carrega informações sobre a amostra⁷⁸. Além disso, a técnica possui diversas vantagens, que incluem: rápida obtenção dos resultados, baixo-custo, livre de reagentes, sustentável, não-invasiva, necessita de pouco volume amostral, dispensa preparo prévio e requer pouco conhecimento técnico para manuseio do aparelho^{80,81,82}.

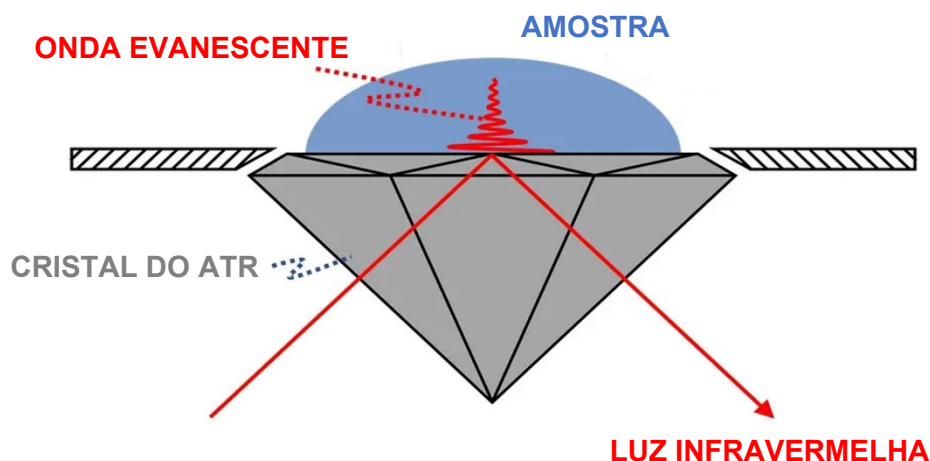


Figura 4. Representação do funcionamento do ATR-FTIR. Imagem modificada de: SPECAC. Disponível em: <https://specac.com/theory-articles/introduction-to-atr-ftir-spectroscopy-part-1-the-basics/>. Acesso em 5 de dezembro de 2023.

Diversas amostras biológicas podem ser analisadas em ATR-FTIR, como saliva, sangue e urina, por exemplo. Algumas amostras biológicas possuem extensos estudos em espectroscopia ATR-FTIR e os correspondentes moleculares dos seus espectros são conhecidos. Ou seja, sabe-se o que cada parte do comprimento de onda da amostra representa: lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas etc. A saliva já foi amplamente estudada através da espectroscopia e grande parte de seus correspondentes moleculares já foram descritos na literatura^{78,83}. O ATR-FTIR tem sido utilizado em diversos estudos

para identificação de biomarcadores salivares de inúmeras doenças, como câncer de mama (90% de sensibilidade e 80% de especificidade)⁸¹, diabetes mellitus tipo 2 (93,3% de sensibilidade, 74% de especificidade e 87% de acurácia)⁸², câncer de boca (100% de sensibilidade, 89% de especificidade e 95% de acurácia)⁸⁴, covid-19 (sensibilidade de 99,2% e especificidade de 100%)⁸⁵, doença renal crônica (92,8% de sensibilidade e 85,7% de especificidade)⁸⁶, entre outros. Embora outras plataformas biofotônicas tenham sido utilizadas para detecção do EV71, como a ressonância de plasmon de superfície, sensores eletroquímicos e espectroscopia Raman, ainda não há evidência científica da utilização do ATR-FTIR como plataforma diagnóstica desse vírus^{65,87}.

É reconhecido que a saliva apresenta diversas vantagens como fluido diagnóstico, como abordado anteriormente. Destaca-se, entre essas vantagens, a coleta não invasiva, que a torna mais aceitável para os pacientes, especialmente considerando que as infecções pelo EV71 geralmente afetam crianças. Ademais, seu baixo custo facilitaria a coleta em larga escala, sobretudo durante surtos e epidemias das doenças causadas pelo EV71 que esporadicamente ocorrem em todo o mundo, o que permitiria um rastreio epidemiológico mais abrangente da infecção. Assim, possíveis complicações da doença e sobrecarga dos sistemas de saúde poderiam ser evitados, através da detecção viral precoce que permite intervenção imediata e previne a progressão da infecção para formas mais graves. Dessa forma, considerando o fato de que o EV71 sabidamente está presente na orofaringe, estudos que abordem a utilização da saliva como fluido diagnóstico para detecção desse vírus e de possíveis biomarcadores salivares da infecção são necessários. Além disso, o ATR-FTIR tem se mostrado uma potencial ferramenta diagnóstica com adequados valores de sensibilidade, especificidade e acurácia. Apesar da sua utilização em uma ampla gama de doenças, seu potencial como ferramenta de detecção do EV71 ainda não foi testado.

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a presença de biomarcadores salivares do Enterovírus 71 em espectroscopia ATR-FTIR e, como objetivos específicos:

- 1) Identificar a presença de biomarcadores salivares do EV71 através da comparação dos espectros de salivas infectadas com o vírus e hígidas avaliadas em espectroscopia ATR-FTIR.
- 2) Avaliar se há correlação entre a carga viral e a detecção de biomarcadores salivares do EV71 em ATR-FTIR através de ensaio in vitro utilizando 8 concentrações diferentes do vírus.
- 3) Desenvolver um protótipo de diagnóstico biofotônico pela análise com Inteligência Artificial do perfil infravermelho da saliva obtido através do ATR-FTIR.

2. CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1

Salivary detection of Enterovirus 71 using a biophotonic platform supported with artificial intelligence algorithms towards a diagnostic platform for EV71 infectious diseases

Deborah Cristina Teixeira Alves¹, Marco Guevara-Vega¹, Camila Moreira de Andrade¹, Douglas Carvalho Caixeta¹, Igor Andrade Santos², Shiraz Feferbaum-Leite², Murillo Guimarães Carneiro³, Ana Carolina Gomes Jardim², Robinson Sabino-Silva¹

¹ Innovation Center in Salivary Diagnostic and Nanobiotechnology, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

² Laboratory of Antiviral Research, Institute of Biomedical Science, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

³ Faculty of Computing, Federal University of Uberlandia, UFU, Minas Gerais, Brazil.

***Corresponding Author:**

Robinson Sabino-Silva; Federal University of Uberlandia (UFU),
Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS,
Av. Pará, 1720, Campus Umuarama, CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil
E-mail: robinsonsabino@gmail.com

Abstract

The Enterovirus 71 (EV71) infection is commonly associated with diseases such as Hand-Foot-and-Mouth Disease (HFMD) and herpangina, which are typically self-limiting and cause mild symptoms. However, due to its neurotropism, EV71 can lead to severe neurological complications, resulting in serious sequelae and even death. Novel label-free and saliva-based platforms to detect EV71 could be a promising alternative to swab tests. The present study aimed to investigate the accuracy of Attenuated Total Reflection Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) to detect EV71 mixed in a ten-fold serial dilution in human saliva. In this context, we used ATR-FTIR supported by machine learning algorithms to detect EV71 diluted in 8 different concentrations: 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10, and 1 PFU/mL. Four algorithms were applied to differentiate the EV71-infected saliva compared to the control saliva. The most successful model was obtained using Adaptive Boosting (AdaBoost) with an accuracy of 70%, sensitivity of 70%, and specificity of up to 80% for 1×10^7 PFU/mL titration. This proof-of-concept study demonstrates the potential of this reagent-free, sustainable biophotonic platform using an ultra-low saliva volume to detect EV71 in concentrations higher than 1×10^7 PFU/mL.

Keywords: Enterovirus 71, Human; Fourier Transform Infrared Spectroscopy; saliva.

Introduction

The Enterovirus 71 (EV71) is an RNA virus, belonging to the *Enterovirus* genus and *Picornaviridae* family [1-3]. Its infection is commonly associated with diseases such as Hand-Foot-and-Mouth Disease (HFMD) and herpangina, which are typically self-limiting and cause mild symptoms. However, due to its neurotropism, EV71 can lead to severe neurological complications, resulting in serious sequelae and even death. It is estimated that approximately 10-20% of EV71 infections progress to involve the central nervous system [2-6]. Viral transmission occurs by direct person-to-person contact with body fluids, including saliva, nose secretion, throat secretion, vesicle fluid, or stool of an EV71-infected subject person. Additionally, transmission can occur through surfaces and objects contaminated with this virus [1, 5, 7]. Diseases related to EV71 primarily affect children, although adolescents and adults can also be affected. Adults, often asymptomatic or with mild symptoms, play a crucial role as carriers, contributing to diagnostic challenges and virus dissemination [8, 9]. The mechanisms by which EV71 causes more symptoms in children are not fully understood. It is believed to be associated with prior exposure to the virus in adults and adolescents while children may be subject to primary infection, combined with inadequate hygiene practices in younger children, exposing them to a higher viral load [10]. Although uncommon, fatal cases and severe neurological involvement in adults, adolescents due to EV71 infection were documented previously [11-13].

Epidemiological data on EV71 infection are more commonly associated with HFMD, as this virus is one of the most prevalent serotypes in outbreaks worldwide, especially in the Southeast Asian and Western Pacific regions. Countries such as Vietnam, Singapore, Taiwan, Malaysia, and China frequently detected EV71 outbreaks. However, several countries globally reported cases of diseases related to EV71, including the United States, Brazil, Australia, European and African nations, with occasional outbreaks linked to EV71. In this context, EV71 infectious and its complications are a global public health issue [2, 3, 7, 14].

The detection of EV71 has been performed based on clinical manifestations and previous contact with infected individuals using limited

detection through molecular testing [15]. Samples for laboratory investigation include throat, rectum, and ulcer swabs, as well as the collection of serum, urine, and cerebrospinal fluid [16]. Nowadays, the gold standard EV71 laboratory detection is viral isolation, primarily performed using human rhabdomyosarcoma cells and African green monkey kidney cells (Vero) [16, 17]. Following virus isolation, the EV71 detection can be performed by neutralizing antibody tests, reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR), EV71 detection by real-time RT-PCR, and indirect immunofluorescence tests with anti-EV71 monoclonal antibodies. Other alternative diagnostic methods for EV71 were tested including the detection of anti-EV71 IgM antibodies using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) associated with protein-induced aggregation of colloidal gold nano-stars for EV71 detection. However, the current laboratory techniques have some disadvantages, such as delayed results, risk of cross-contamination, high operational costs, need for specific primers, specialized training for laboratory technicians, and difficulty in accessing necessary materials in some regions. [16-19].

Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy is a reagent-free fingerprinting platform that, by emitting infrared light, obtains a spectrum with specific sample characteristics. This sustainable platform permits a direct biofluid application, such as blood, saliva, feces, and urine [20-22]. Saliva contains a diverse array of proteins, lipids, carbohydrates, and metabolites crucial to several biological functions. Changes in the levels of these biomolecules can serve as potential biomarkers to oral and systemic diseases. These characteristics of saliva can be used in novel diagnostic tool with the potential to facilitate disease detection and monitoring [23]. Additionally, salivary diagnosis is non-invasive, low-cost, easily transportable, and it is more easily accepted by patients compared to blood testing, making it ideal for large-scale epidemiological studies and disease screening [24]. ATR-FTIR has been used in several studies to identify salivary biomarkers for various illnesses, including systemic diseases such as breast cancer [21] and chronic kidney disease [26], as well as viral infections like COVID-19 [25] and zika virus [48], for example. However, there is no scientific evidence on the use of ATR-FTIR to

identify salivary biomarkers for EV71. Therefore, this study aimed to evaluate the accuracy of ATR-FTIR coupled with artificial intelligence algorithms for discriminating between non-infected saliva and saliva infected with different concentrations of EV71.

Methods

Cell culture. Vero E6 cells (a kidney tissue derived from a normal adult African green monkey, ATCC E6) were grown in minimal Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM; Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 100 U/ mL penicillin (Gibco Life Technologies, USA), 100 U/mL streptomycin (Gibco Life Technologies, USA), 1 % HEPES (Gibco Life Technologies, USA), and 10 % fetal bovine serum (FBS; Gibco Life Technologies, USA) at 37 °C in a humidified incubator with 5 % CO₂.

EV71 rescue and titration. An EV71 reverse genetics system was generated from the strain MS/7423/87. The plasmids were linearized with XhoI (ThermoFisher Scientific) and purified using Wizard® DNA Clean-Up System (Promega). The linearized DNA was transcribed using the HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB). The infectious RNA was electroporated into Vero cells (1×10^6 cells) at 250 μ F and 450 V [1, 47]. After 48 h, the supernatant was harvested and titrated as follows: Vero cells were seeded in 96 well plates at 1×10^4 cells/well 24 h before infection with EV71 cell culture supernatants diluted in a 10-fold serial dilution in DMEM. After incubation for 48 h cells were fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA) and stained with crystal violet 0.5 % for 30 min. Titers were determined using the 50 % tissue culture infectious dose (TCID₅₀) method and calculated by the Spearman & Karber " algorithm as described by Killington and Hierholzer [27]. All work was performed at biosafety level 2 under the authorization number SEI: 01245.006267/2022-14 CBQ: 163/02 from the CTNBio — National Technical Commission for Biosecurity from Brazil.

Collection of saliva samples. Experimental procedures were conducted following the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (protocol number 30848620.1.3009.5152). Written informed consent was obtained from the 10 healthy subjects of the present study before sample

collection and all participants were over 18 years old. The unstimulated saliva was collected for 5 min in the morning between 9 AM and 10 AM to avoid changes in circadian rhythm from ten participants in sterile conical polypropylene tubes (Kolpast, Brazil) for ATR-FTIR analysis. Subjects were asked to refrain from eating, drinking (except water), or tooth-brushing for at least 1 hour before the saliva collection and all participants were non-smokers and were not undergoing orthodontic treatment.

EV71 sample preparation. For ATR-FTIR measurement, healthy human saliva samples were spiked with EV71 at eight dilutions (1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10, and 1 PFU/mL). A set of non-infected saliva samples was used as a control.

The samples were prepared in a biosafety level 2 (BSL2) room to ensure the researcher's safety. The saliva samples collected from participants were distributed in eight aliquots containing a saliva volume of 270 μ L in each 1.5 mL microtube. A ten-fold serial dilution was performed by applying 30 μ L of a concentrated EV71 diluted in PBS 1X. The dilutions were made by passing the volume of 30 μ L, in order to reach a 1:10 dilution. The data set consisted of 80 saliva samples divided into eight for each dilution. Another ten non-infected saliva samples were used as a control. The samples were immediately analyzed in ATR-FTIR after dilution.

ATR-FTIR spectroscopy: Samples were recorded in a portable ATR-FTIR spectrophotometer (Agilent Cary 630 FTIR, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Each spectrum was recorded with 2 cm^{-1} of resolution and 64 scans per sample in the range of 650 to 4000 cm^{-1} . The ATR-FTIR spectra was obtained with only 2 μ L of each sample added to the ATR crystal and allowed to dry for 7 minutes at room temperature inside the laminar cabin with activated airflow. After the spectrum acquisition, and before the next analysis, the ATR crystal was cleaned with alcohol (70% v/v) and dried using a clean paper towel. A background spectrum was obtained before each measurement for a new sample to remove environmental changes [26, 28].

Data pre-processing. Each spectra from every dilution was processed using Orange 3.3.5 software with selected pre-processing parameters formulated in

machine learning techniques. For the average dilution spectra, the baseline was corrected by the Rubberband method and then the spectra were normalized. Subsequently, the principal component analysis (PCA) was applied using the lipidic region ($3050 - 2800 \text{ cm}^{-1}$) and the fingerprint region ($1800 - 900 \text{ cm}^{-1}$) of the original spectra. There, PCA was applied as the initial exploratory analysis of the spectral data [22].

Predictive Analysis by Machine Learning Algorithms. The infrared spectral dataset analysis was divided into two steps: pre-processing and classification model. Pre-processing of the infrared spectral dataset consisted of aggregation, attribute selection, and spectral data transformation. The spectral profile of each sample was performed in aggregation. Then, the spectral data were truncated with the lipidic region ($3050 - 2800 \text{ cm}^{-1}$) and the fingerprint region ($1800 - 900 \text{ cm}^{-1}$) and, after, spectra were pre-processed considering an attribute selection method, using Raw data, Vector normalization + Rubberband, Smooth5+Min-Max Normalization+Rubberband and Smooth2+Vector normalization. The classification was tested with four algorithms: AdaBoost, Artificial Neural Networks, Random Forest, and Support Vector Machine. AdaBoost is a well-known ensemble method that often combines multiple models (called weak learners) to obtain a model (called strong learner) in which errors of weak learners are minimized [29]. The procedure was carried out at Orange: Data Mining Toolbox in Python software [30]. To measure the results obtained, three performance measures consolidated in the literature were used: sensitivity, specificity, and accuracy [22].

Results

Salivary infrared profile. The salivary spectrum of non-infected saliva (used as control) was compared with EV71-infected saliva at different concentrations of the virus. Figure 1A indicates differences in the mean spectrum at 1×10^7 concentration between non-infected and infected saliva. The spectra for other reduced concentrations of EV71 in saliva (1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10, and 1 PFU/mL) display a similar infrared spectrum compared to non-infected saliva (Figures 1B-H).

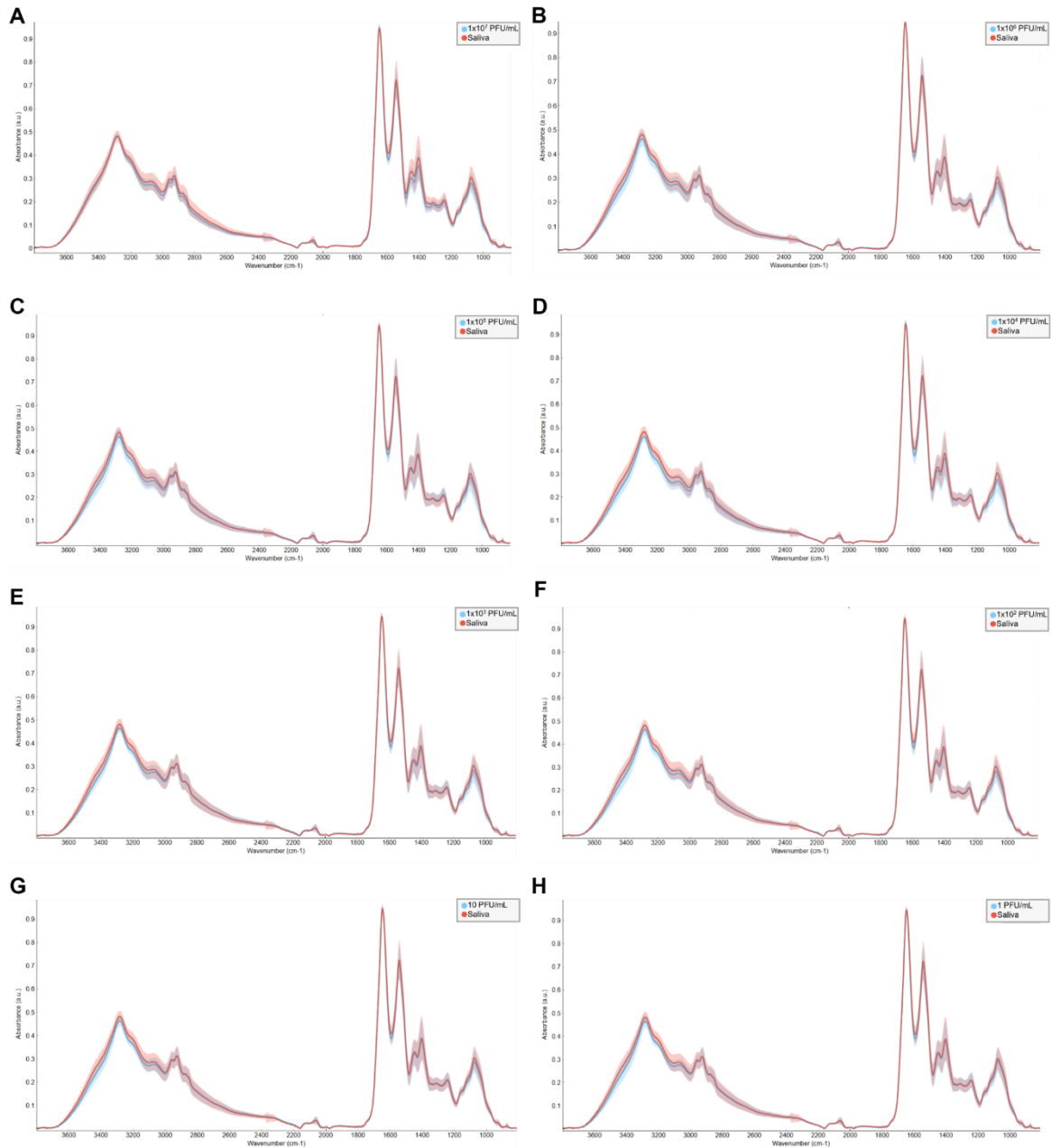


Figure 1. The mean spectrum profile with the standard deviation in a baseline correction by the Rubberband method and normalization Min-Max pre-processing for each EV71 dilution comparing with control non-infected saliva: **A)** 1×10^7 PFU/mL, **B)** 1×10^6 PFU/mL, **C)** 1×10^5 PFU/mL, **D)** 1×10^4 PFU/mL, **E)** 1×10^3 PFU/mL, **F)** 1×10^2 PFU/mL, **G)** 10 PFU/mL and **H)** 1 PFU/mL.

PCA analysis. The PCA analysis was performed to display differences in salivary spectra of saliva control and each dilution (Fig. 2A-H). Two principal components (PCs) named PC1 and PC2 explained the cumulative variance, leading to the following results: PC1: 96%, PC2: 2%, and cumulative variance of 98% for 1×10^7

PFU/mL; PC1: 94%, PC2: 3% and cumulative variance of 97% for 1×10^6 PFU/mL; PC1: 95%, PC2: 2% and cumulative variance of 97% for 1×10^5 PFU/mL; PC1: 95%, PC2: 2% and cumulative variance of 97% for 1×10^4 PFU/mL; PC1: 96%, PC2: 1% and cumulative variance of 97% for 1×10^3 PFU/mL; PC1: 95%, PC2: 2% and cumulative variance of 97% for 1×10^2 PFU/mL; PC2 1% and cumulative variance of 97% for 10 PFU/mL; and PC1: 96%, PC2: 1% and cumulative variance of 97% for 1 PFU/mL. The relation between PC1 and PC2 shows a heterogeneous difference across both groups illustrated in the scores plot for each dilution (Figure 2A-H).

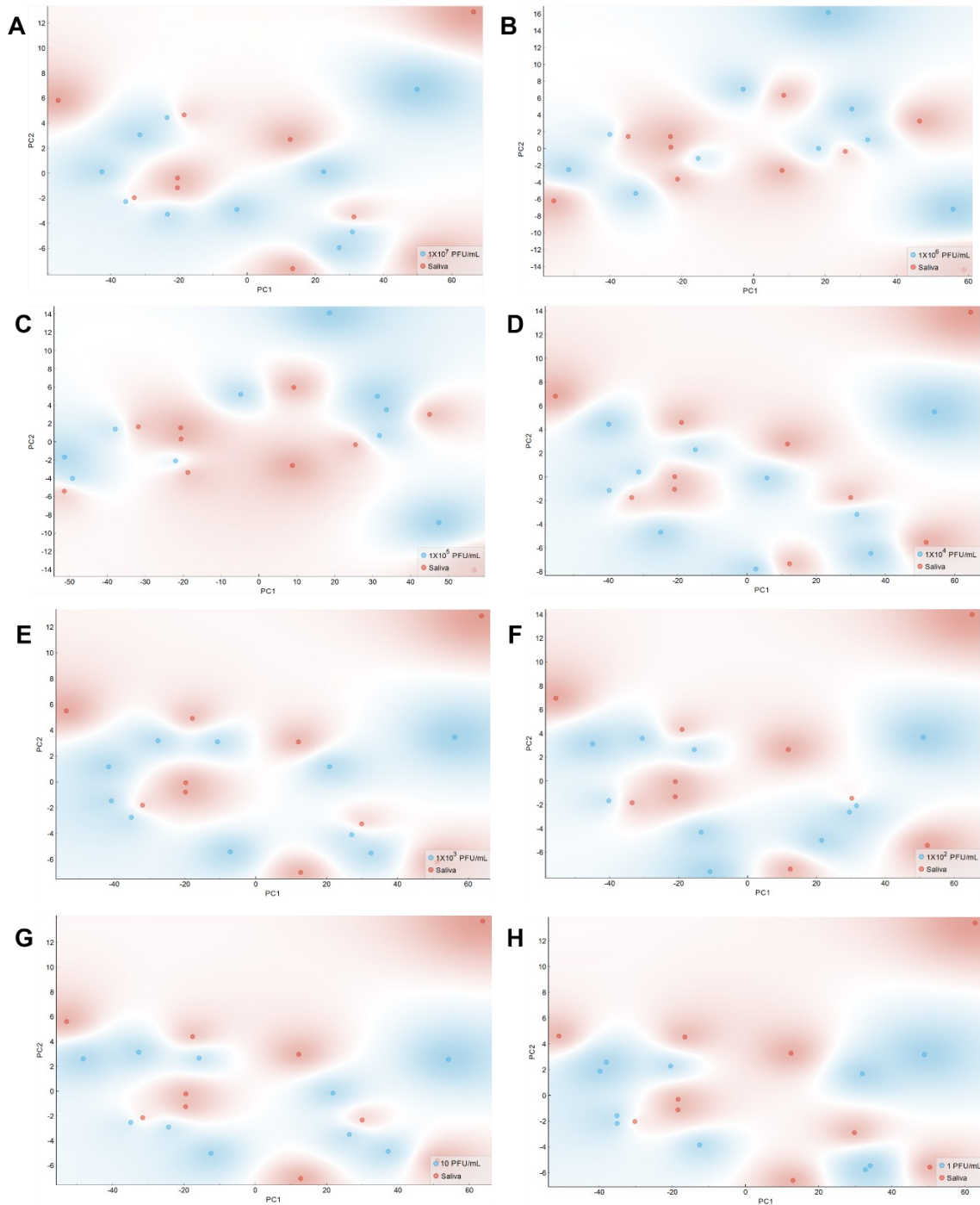


Figure 2. Principal Component Analysis (PCA) score plot to PC1 vs. PC2 for the titration **A)** 1x10⁷ PFU/mL, **B)** 1x10⁶ PFU/mL, **C)** 1x10⁵ PFU/mL, **D)** 1x10⁴ PFU/mL, **E)** 1x10³ PFU/mL, **F)** 1x10² PFU/mL, **G)** 10 PFU/mL and **H)** 1 PFU/mL.

Discrimination analysis. The performances of accuracy, sensitivity, and specificity using AdaBoost, Artificial Neural Networks, Random Forest, and Support Vector Machine algorithms with different pre-processing data performed

on salivary infrared spectra obtained from different concentrations of EV71 in saliva are presented in Table 1. The results obtained in these analyses indicate that the best discrimination was the 1×10^7 PFU/mL titration, using the AdaBoost algorithm pre-processed with the Smooth5+Min-Max Normalization+Rubberband ($3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$; $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$), followed by Smooth2+vector normalization. The AdaBoost platform was capable of distinguishing the concentration of 1×10^7 PFU/mL with an accuracy of 70%, sensitivity of 70%, and specificity of 80%. The discrimination for the other concentrations of EV71 (1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10, and 1 PFU/mL) was not effective since they presented accuracy mostly lower than 50%.

Table 1. Predictive Performance of AdaBoost, Artificial Neural Networks (ANN), Random Forest, and Support Vector Machine (SVM) algorithms to discriminate different concentrations of EV71 in saliva by ATR-FTIR spectroscopy.

Titration : PFU/mL	Pre-processing (band)	Algorithm Model	Accuracy	Sensitivity	Specificity
1×10^7	Raw data ($3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$; $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$)	AdaBoost	0.45	0.5	0.4
		ANN	0.4	0.4	0.4
		Random Forest	0.15	0.3	0
		SVM	0.1	0.2	0
	Vector Normalization + Rubberband ($3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$; $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$)	AdaBoost	0.45	0.3	0.6
		ANN	0.45	0.6	0.3
		Random Forest	0.25	0.4	0.1
		SVM	0.5	0.9	0.1
	Smooth5+Min-Max Normalization + Rubberband ($3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$; $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$)	AdaBoost	0.7	0.6	0.8
		ANN	0.4	0.5	0.3
		Random Forest	0.45	0.6	0.3
		SVM	0.6	1	0.2
	Smooth2+vector normalization	AdaBoost	0.7	0.7	0.7
		ANN	0.25	0.40	0.1
		Random Forest	0.25	0.4	0.1
		SVM	0.4	0.8	0
	Raw data ($3050\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$; $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$)	AdaBoost	0.15	0.1	0.2
		ANN	0.25	0.3	0.2
		Random Forest	0.2	0.2	0.2
		SVM	0	0	0
		AdaBoost	0.45	0.4	0.5

1x10⁶	Vector	ANN	0.3	0.4	0.2
	Normalization	Random	0.25	0.3	0.2
	+ Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	Forest			
		SVM	0.2	0.4	0
	Smooth5+Min-Max	AdaBoost	0.45	0.4	0.5
	Normalization	ANN	0.3	0.4	0.2
	+ Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	Random	0.25	0.3	0.2
		Forest			
		SVM	0.2	0.4	0
	Smooth2+vector	AdaBoost	0.35	0.36	0.33
	normalization	ANN	0.35	0.4	0.3
		Random	0.15	0.2	0.1
		Forest			
1x10⁵	Raw data (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	SVM	0.25	0.5	0
		AdaBoost	0.35	0.5	0.2
		ANN	0.4	0.3	0.5
		Random	0.45	0.5	0.4
		Forest			
		SVM	0	0	0
	Vector	AdaBoost	0.3	0.3	0.3
	Normalization	ANN	0.3	0.2	0.4
	+ Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	Random	0.25	0.3	0.2
		Forest			
		SVM	0	0	0
	Smooth5+Min-Max	AdaBoost	0.15	0.2	0.1
	Normalization	ANN	0.3	0.2	0.4
	+ Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	Random	0.01	0.01	0.01
		Forest			
		SVM	0	0	0
	Smooth2+vector	AdaBoost	0.2	0.1	0.3
	normalization	ANN	0.2	0.2	0.2
		Random	0.15	0.2	0.1
		Forest			
		SVM	0.05	0.1	0
	Raw data (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.15	0.2	0.1
		ANN	0.35	0.3	0.4
		Random	0.05	0.1	0
		Forest			
		SVM	0.1	0.1	0.1
1x10⁴	Vector	AdaBoost	0.3	0.2	0.4
	Normalization	ANN	0.4	0.4	0.4
	+ Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	Random	0.15	0.2	0.1
		Forest			
		SVM	0.3	0.6	0
	Smooth5+Min-Max	AdaBoost	0.3	0.2	0.4
	Normalization	ANN	0.35	0.5	0.2
	+ Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	Random	0.2	0.3	0.1
		Forest			
		SVM	0.3	0.6	0
		AdaBoost	0.4	0.4	0.4
		ANN	0.45	0.5	0.4

1x10³	Smooth2+vector normalization	Random Forest	0.3	0.3	0.3
		SVM	0.2	0.4	0
	Raw data (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.2	0.1	0.3
		ANN	0.3	0.2	0.4
		Random Forest	0.15	0.2	0.1
		SVM	0	0	0
	Vector Normalization + Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.35	0.4	0.3
		ANN	0.25	0.2	0.3
		Random Forest	0.15	0.2	0.1
		SVM	0.3	0.6	0
	Smooth5+Min-Max Normalization + Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.35	0.5	0.2
		ANN	0.1	0.1	0.1
		Random Forest	0.1	0.1	0.1
		SVM	0.3	0.6	0
	Smooth2+vector normalization	AdaBoost	0.2	0.2	0.2
		ANN	0.25	0.3	0.2
		Random Forest	0.15	0.2	0.1
		SVM	0.45	0.7	0.2
1x10²	Raw data (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.15	0.1	0.2
		ANN	0.65	0.6	0.7
		Random Forest	0.05	0.1	0
		SVM	0.05	0.1	0
	Vector Normalization + Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.2	0	0.4
		ANN	0.35	0.3	0.4
		Random Forest	0.2	0.3	0.1
		SVM	0.3	0.6	0
	Smooth5+Min-Max Normalization + Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.15	0.1	0.2
		ANN	0.15	0.1	0.2
		Random Forest	0.1	0.1	0.1
		SVM	0.35	0.6	0.1
	Smooth2+vector normalization	AdaBoost	0.2	0.2	0.2
		ANN	0.4	0.5	0.3
		Random Forest	0.1	0.1	0.1
		SVM	0.1	0.2	0
10	Raw data (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.45	0.4	0.5
		ANN	0.35	0.4	0.3
		Random Forest	0.2	0.3	0.1
		SVM	0	0	0
	Vector Normalization + Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.5	0.5	0.5
		ANN	0.3	0.2	0.4
		Random Forest	0.15	0.2	0.1
		SVM	0.1	0.2	0

1	Smooth5+Min-Max Normalization + Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.5	0.6	0.4
		ANN	0.1	0.1	0.1
		Random Forest	0	0	0
		SVM	0.4	0.8	0
	Smooth2+vector normalization	AdaBoost	0.5	0.5	0.5
		ANN	0.3	0.3	0.3
		Random Forest	0.05	0	0.1
		SVM	0.4	0.7	0.1
	Raw data (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.3	0.2	0.4
		ANN	0.35	0.4	0.3
		Random Forest	0.45	0.4	0.5
		SVM	0	0	0
	Vector Normalization + Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.55	0.7	0.4
		ANN	0.2	0.2	0.2
		Random Forest	0.1	0.1	0.1
		SVM	0	0	0
	Smooth5+Min-Max Normalization + Rubberband (3050-2800 cm ⁻¹ ; 1800-900 cm ⁻¹)	AdaBoost	0.6	0.7	0.5
		ANN	0.1	0.1	0.1
		Random Forest	0	0	0
		SVM	0.1	0.1	0.1
	Smooth2+vector normalization	AdaBoost	0.4	0.33	0.42
		ANN	0.25	0.3	0.2
		Random Forest	0	0	0
		SVM	0.35	0.7	0

Afterward, Shapley Additive Explanations (SHAP) values of each feature within the AdaBoost algorithm in 1×10^7 concentration were obtained to select the most prominent features and bands responsible for discriminating the non-infected and EV71-infected saliva. As a result, the SHAP feature importance presented ten wavenumbers: 1716.4391 cm⁻¹, 1223.4986 cm⁻¹, 1547.777 cm⁻¹, 2946.4606 cm⁻¹, 1353.0236 cm⁻¹, 937.4255 cm⁻¹, 1472.2984 cm⁻¹, 2803.8899 cm⁻¹, 1078.1325 cm⁻¹ and 2952.9834 cm⁻¹ (Fig. 3). The molecular assignments of each vibrational mode indicated by the SHAP are described in Table 2.

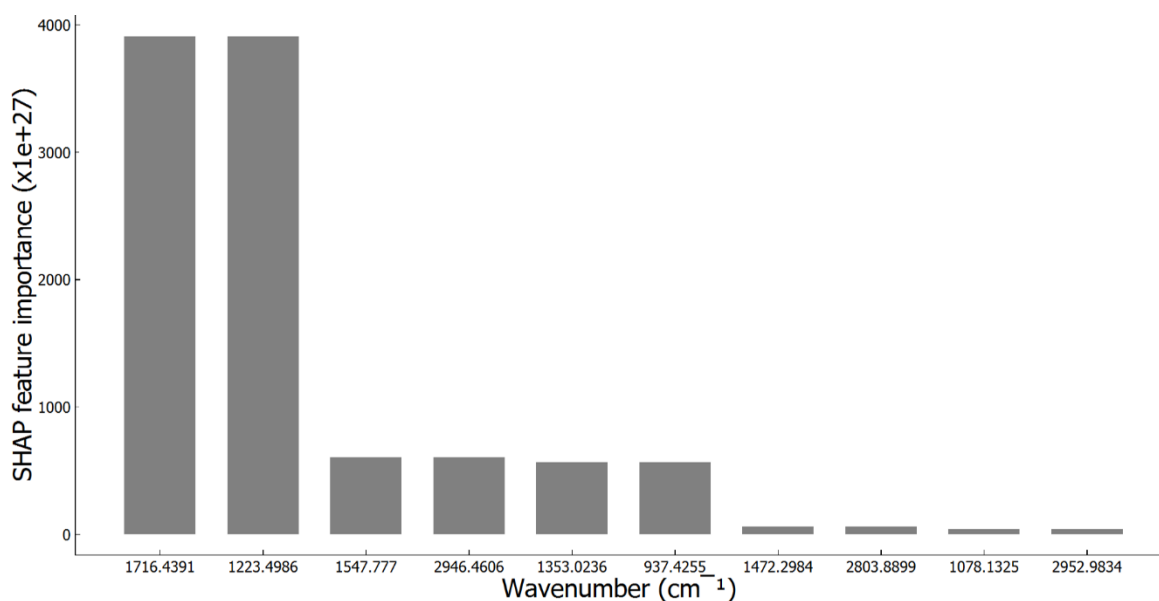


Figure 3. The feature importance (SHAP value) graph of AdaBoost model to distinguish non-infected and EV71-infected saliva samples.

Table 2. Band assignment of SHAP value of each feature within the AdaBoost model to discriminate non-infected and EV71-infected saliva and its molecular assignments.

Wavenumber	Band Assignment	Biomolecular components
1716	Amide I [31]	Protein
1223	Amide III/Phospholipids [26]	Protein
1547	Amide II [32]	Protein
2946	Stretching C-H [33]	Lipids
1353	Amide III [21]	Protein
937	CH ₃ -N asymmetric stretching C-O, C-C stretching C-O-H, C-O-C deformation [26]	Carbohydrates/phospholipids
1472	Asymmetric CH ₃ bending [26]	Protein
2803	Stretching N-H [33]	Lipids
1078	C-O and C-C stretching and C-O-H deformation [34]	Carbohydrates/phospholipids

2952	CH ₃ asymmetric stretching [34]	Lipids
------	---	--------

Discussion

The EV71 infectious is associated with severe neurological complications such as aseptic meningitis, encephalitis, pulmonary edema, myocarditis, meningoencephalitis, acute flaccid paralysis, encephalomyelitis, neurorespiratory syndrome, circulatory disorders, cardiopulmonary failure, and neonatal sepsis [2-8]. Early detection of this virus can play a crucial role in preventing EV71 outbreaks. In this context, ATR-FTIR coupled with artificial intelligence algorithms, combined with the use of saliva as a diagnostic fluid, emerges as a rapid, non-invasive, cost-effective, reagent-free, and sustainable alternative for salivary detection of EV71, enabling epidemiological screening for prevention and containment of outbreaks.

Currently, EV71 diagnosis is primarily conducted through clinical examinations. However, clinical diagnosis relies on typical disease signs and symptoms [15]. In certain instances, these manifestations may not occur leading to the spread of viral infections. Approximately 29% of EV71 infections during the 2008-2009 HFMD epidemic in Taiwan were asymptomatic [35]. Moreover, HFMD caused by EV71 may exhibit symptoms different from non-EV71 viruses, resulting in potential misdiagnosis [36]. Identifying the causative agent of HFMD and other EV71-related diseases during outbreaks is crucial for preventing possible complications. Similar to other enteroviruses, laboratory confirmation involves cell culture, viral isolation, and identification. Following viral isolation, virus identification can be achieved through tests such as neutralization tests, RT-PCR, EV71-specific RT-PCR, and others. However, these techniques are time-consuming, and expensive, often requiring specific primers and specialized training [16-18]. Therefore, new diagnostic platforms allowing rapid, effective, and low-cost identification for EV71 surveillance should be explored.

In the current study, this biophotonic platform identified EV71 at a concentration of 1×10^7 PFU/mL with higher accuracy. There is a limitation of

studies on EV71 viral load in humans, and we did not find research investigating its titration in saliva. Consequently, we cannot determine how this specific viral concentration may have practical applications in humans. Similar concentrations were found in murine in vivo studies. Liao et al.'s study (2014) demonstrated titration peaks above 1×10^8 PFU/mL of EV71, 2-3 days post-infection in serum of non-obese diabetic immunodeficient mice [37]. EV71 serum levels were higher than 1×10^6 PFU/mL in one-day-old ICR mice 78 hours after infectious challenge with EV71 [38]. Blood plasma and cerebrospinal fluid showed lower levels of EV71 compared to throat and intestinal swabs, which suggest higher viral loads in feces and fluids of oropharynx [39, 40].

We were able to identify an accuracy and sensitivity of 70% and a specificity of up to 80% in distinguishing salivary spectra obtained by ATR-FTIR between control saliva and infected saliva at 1×10^7 PFU/mL concentration. Similar percentages were found in an RT-PCR study on different samples, where the throat swab obtained 80% sensitivity [39]. These results demonstrate saliva potential for EV71 identification with an ultra-low sample volume, coupled with a reagent-free spectroscopy platform. Although EV71 is present in the oropharynx, one of its primary sites of viral replication after initial infection, the effectiveness of saliva and diagnostic potential for its detection has received limited attention [24]. Considering that EV71 infection primarily affects children under 5 years old and adults can carry the virus contributing to its spread, saliva emerges as a potential diagnostic fluid for the disease due to its non-invasiveness, easy collection, and greater patient acceptance for its comfort, unlike current diagnostic methods such as oropharyngeal swabs, rectal swabs, and blood collection. Few studies have investigated salivary biomarkers for EV71. The circulating miRNA hsa-miR-221 was identified in salivary samples from HFMD-positive patients as an EV71 biomarker with an efficacy of 77-92%, suggesting a potential role in salivary diagnostic of this viral disease [41]. Besides, it was identified 19 upregulated and 51 downregulated proteins in the saliva of HFMD patients, highlighting the potential of the salivary legumain protein as an EV71 salivary biomarker [42]. In line with this previous study, our work demonstrated through the SHAP plot those vibrational modes at 1716 cm^{-1} and 1223 cm^{-1} corresponding to proteins achieved the best discriminatory results between the

control and infected saliva groups, emphasizing that EV71 induces changes in salivary proteins that can act as biomarkers. We suggest that further studies on potential salivary biomarkers for EV71 be conducted to develop new diagnostic platforms using this fluid.

ATR-FTIR has proven to be a powerful diagnostic screening platform for viral diseases with adequate sensitivity and specificity, such as COVID-19 [43], HIV/AIDS [44], dengue, and Chikungunya [45]. Other bio-photonic platforms have been explored as diagnostic tools for HFMD, such as surface plasmon resonance, electrochemical sensors, and Raman spectroscopy [19, 46]. Our study has some limitations that should be noted. The concentration of 1×10^7 PFU/mL which yielded the best results, lacks scientific validation for its practical application in humans. Additionally, we believe that saliva collected from in vivo assays may yield different results from those demonstrated in this study. However, our study is pioneering in exploring the use of ATR-FTIR as a diagnostic tool with salivary analysis for EV71. Our research also demonstrated that machine learning algorithms, especially AdaBoost, were strong allies for result improvements obtained by ATR-FTIR spectroscopy.

Conclusion

The AdaBoost algorithm, at a concentration of 1×10^7 PFU/mL, achieved the best results, with an accuracy of 70%, sensitivity of 70%, and specificity of up to 80%. Our findings illustrate the potential of ATR-FTIR coupled with artificial intelligence algorithms as a sustainable, non-invasive, and cost-effective platform for salivary detection of EV71, serving as a potential screening tool for Hand-Foot-and-Mouth Disease, herpangina, and other EV71-related diseases.

References

- 1- Shimizu, J. F., Feferbaum-Leite, S., Santos, I. A., Martins, D. O. S., Kingston, N. J., Shegdar, M., Zothner, C., Sampaio, S. V., Harris, M., Stonehouse, N. J., & Jardim, A. C. G. (2023). Effect of proteins isolated from Brazilian snakes on enterovirus A71 replication cycle: An approach against

- hand, foot and mouth disease. *International journal of biological macromolecules*, 241, 124519.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124519>
- 2- Huang, P. N., & Shih, S. R. (2014). Update on enterovirus 71 infection. *Current opinion in virology*, 5, 98–104.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.007>
 - 3- Lee, T. C., Guo, H. R., Su, H. J., Yang, Y. C., Chang, H. L., & Chen, K. T. (2009). Diseases caused by enterovirus 71 infection. *The Pediatric infectious disease journal*, 28(10), 904–910.
<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181a41d63>
 - 4- Zhang, W., Huang, Z., Huang, M., & Zeng, J. (2020). Predicting Severe Enterovirus 71-Infected Hand, Foot, and Mouth Disease: Cytokines and Chemokines. *Mediators of inflammation*, 2020, 9273241.
<https://doi.org/10.1155/2020/9273241>
 - 5- Saguil, A., Kane, S. F., Lauters, R., & Mercado, M. G. (2019). Hand-Foot-and-Mouth Disease: Rapid Evidence Review. *American family physician*, 100(7), 408–414.
 - 6- Carmo, R. L. D., Alves Simão, A. K., Amaral, L. L. F. D., Inada, B. S. Y., Silveira, C. F., Campos, C. M. S., Freitas, L. F., Bonadio, V., & Marussi, V. H. R. (2019). Neuroimaging of Emergent and Reemergent Infections. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 39(6), 1649–1671. <https://doi.org/10.1148/rq.2019190020>
 - 7- Solomon, T., Lewthwaite, P., Perera, D., Cardosa, M. J., McMinn, P., & Ooi, M. H. (2010). Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *The Lancet. Infectious diseases*, 10(11), 778–790.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70194-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70194-8)
 - 8- Esposito, S., & Principi, N. (2018). Hand, foot and mouth disease: current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 37(3), 391–398. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3206-x>
 - 9- Yin, X. G., Yi, H. X., Shu, J., Wang, X. J., Wu, X. J., & Yu, L. H. (2014). Clinical and epidemiological characteristics of adult hand, foot, and mouth

- disease in northern Zhejiang, China, May 2008–November 2013. *BMC infectious diseases*, 14, 251. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-251>
- 10- Chang L, Tsao K, Hsia S, et al. Transmission and Clinical Features of Enterovirus 71 Infections in Household Contacts in Taiwan. *JAMA*. 2004;291(2):222–227. doi:10.1001/jama.291.2.222
 - 11- Hamaguchi, T., Fujisawa, H., Sakai, K., Okino, S., Kurosaki, N., Nishimura, Y., Shimizu, H., & Yamada, M. (2008). Acute encephalitis caused by intrafamilial transmission of enterovirus 71 in adult. *Emerging infectious diseases*, 14(5), 828–830. <https://doi.org/10.3201/eid1405.071121>
 - 12- Chan, K. P., Goh, K. T., Chong, C. Y., Teo, E. S., Lau, G., & Ling, A. E. (2003). Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore. *Emerging infectious diseases*, 9(1), 78–85. <https://doi.org/10.3201/eid0901.020112>
 - 13- Chen, Y. F., Hu, L., Xu, F., Liu, C. J., & Li, J. (2019). A case report of a teenager with severe hand, foot, and mouth disease with brainstem encephalitis caused by enterovirus 71. *BMC pediatrics*, 19(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12887-019-1428-4>
 - 14- Oyero, O. G., & Adu, F. D. (2010). Non-polio enteroviruses serotypes circulating in Nigeria. *African journal of medicine and medical sciences*, 39 Suppl, 201–208
 - 15- Li, X. W., Ni, X., Qian, S. Y., Wang, Q., Jiang, R. M., Xu, W. B., Zhang, Y. C., Yu, G. J., Chen, Q., Shang, Y. X., Zhao, C. S., Yu, H., Zhang, T., Liu, G., Deng, H. L., Gao, J., Ran, X. G., Yang, Q. Z., Xu, B. L., Huang, X. Y., ... Yang, T. (2018). Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of hand, foot and mouth disease (2018 edition). *World journal of pediatrics : WJP*, 14(5), 437–447. <https://doi.org/10.1007/s12519-018-0189-8>
 - 16- Ooi, M. H., Wong, S. C., Lewthwaite, P., Cardosa, M. J., & Solomon, T. (2010). Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *The Lancet. Neurology*, 9(11), 1097–1105. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70209-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70209-X)
 - 17- World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific. (2011). A guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth disease (HFMD). WHO Regional Office for the

Western Pacific. <https://iris.who.int/handle/10665/207490>. Acesso em: 5 jun 2023

- 18- Xu, F., Yan, Q., Wang, H., Niu, J., Li, L., Zhu, F., He, S., Zhang, S., Weng, Z., Cheng, T., Cai, Y., He, D., Chen, Y., Ge, S., Yeo, A. E., Zhang, J., Ng, M. H., & Xia, N. (2010). Performance of detecting IgM antibodies against enterovirus 71 for early diagnosis. *PloS one*, 5(6), e11388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011388>
- 19- Reyes, M., Piotrowski, M., Ang, S. K., Chan, J., He, S., Chu, J. J. H., & Kah, J. C. Y. (2017). Exploiting the Anti-Aggregation of Gold Nanostars for Rapid Detection of Hand, Foot, and Mouth Disease Causing Enterovirus 71 Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Analytical chemistry*, 89(10), 5373–5381. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00066>
- 20- Elkins, K. M. (2011). Rapid presumptive "fingerprinting" of body fluids and materials by ATR FT-IR spectroscopy. *Journal of forensic sciences*, 56(6), 1580–1587. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01870.x>
- 21- Ferreira, I. C. C., Aguiar, E. M. G., Silva, A. T. F., Santos, L. L. D., Cardoso-Sousa, L., Araújo, T. G., Santos, D. W., Goulart, L. R., Sabino-Silva, R., & Maia, Y. C. P. (2020). Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *Journal of oncology*, 2020, 4343590. <https://doi.org/10.1155/2020/4343590>
- 22- Caixeta, D.C., Carneiro, M.G., Rodrigues R., Alves, D.C.T., Goulart, L.R., Cunha, T.M., Espindola F.S., Vitorino, R., Sabino-Silva, R. Salivary ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Support Vector Machine Classification for Screening of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Apr 12;13(8):1396. doi: 10.3390/diagnostics13081396. PMID: 37189497; PMCID: PMC10137088.
- 23- Wong, D. (2012). Salivary Diagnostics. *Operative Dentistry*, 37(6), 562–570. doi:10.2341/12-143-bl
- 24- Slowey, P. D. (2016). Salivary Diagnostics Using Purified Nucleic Acids. *Oral Biology*, 3–15. doi:10.1007/978-1-4939-6685-1_1
- 25- Martinez-Cuazitl, A., Vazquez-Zapien, G. J., Sanchez-Brito, M., Limon-Pacheco, J. H., Guerrero-Ruiz, M., Garibay-Gonzalez, F., Delgado-Macuil, R. J., de Jesus, M. G. G., Corona-Perezgrovas, M. A., Pereyra-Talamantes,

- A., & Mata-Miranda, M. M. (2021). ATR-FTIR spectrum analysis of saliva samples from COVID-19 positive patients. *Scientific reports*, 11(1), 19980. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99529-w>
- 26- Rodrigues, R. P., Aguiar, E. M., Cardoso-Sousa, L., Caixeta, D. C., Guedes, C. C., Siqueira, W. L., Maia, Y. C. P., Cardoso, S. V., & Sabino-Silva, R. (2019). Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. *Brazilian dental journal*, 30(5), 437–445. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902228>
- 27- Killington, R. A., A. Stokes, and J. C. Hierholzer. "In Virology Methods Manual (eds BWJ Mahy & HO Kangro) Ch. Virus Purification, 73–74." (1996).
- 28- Caixeta, D. C., Aguiar, E. M. G., Cardoso-Sousa, L., Coelho, L. M. D., Oliveira, S. W., Espindola, F. S., Raniero, L., Crosara, K. T. B., Baker, M. J., Siqueira, W. L., & Sabino-Silva, R. (2020). Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PloS one*, 15(3), e0223461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223461>
- 29- Schapire, R. E. Explaining AdaBoost. in *Empirical Inference* (eds. Schölkopf, B., Luo, Z. & Vovk, V.) 37–52 (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642- 41136-6_5. 25.
- 30- Demšar, J. et al. Orange: Data Mining Toolbox in Python. *Journal of Machine Learning Research* 14, 2349–2353 (2013).
- 31- Delrue, C.; De Bruyne, S.; Speeckaert, M.M. Unlocking the Diagnostic Potential of Saliva: A Comprehensive Review of Infrared Spectroscopy and Its Applications in Salivary Analysis. *J. Pers. Med.* 2023, 13, 907. <https://doi.org/10.3390/jpm13060907>
- 32- Orphanou, C. M., Walton-Williams, L., Mountain, H., & Cassella, J. (2015). The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. *Forensic science international*, 252, e10–e16. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.04.020>
- 33- Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied spectroscopy reviews*, 43(2), 134-179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>

- 34- Talari, A.C.S.; Martinez, M.A.G.; Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I.U. Advances in Fourier transform infrared (FTIR)spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2017,52, 456–506
- 35- Lee, M. S., Chiang, P. S., Luo, S. T., Huang, M. L., Liou, G. Y., Tsao, K. C., & Lin, T. Y. (2012). Incidence rates of enterovirus 71 infections in young children during a nationwide epidemic in Taiwan, 2008-09. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(2), e1476. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001476>
- 36- Jiang, B., Zhang, J., You, X., Dong, C., Cheng, X., Dai, X., & Meng, J. (2012). Diagnosis of hand, foot, and mouth disease caused by EV71 and other enteroviruses by a one-step, single tube, duplex RT-PCR. *Journal of medical virology*, 84(11), 1803–1808. <https://doi.org/10.1002/jmv.23391>
- 37- Liao, C. C., Liou, A. T., Chang, Y. S., Wu, S. Y., Chang, C. S., Lee, C. K., Kung, J. T., Tu, P. H., Yu, Y. Y., Lin, C. Y., Lin, J. S., & Shih, C. (2014). Immunodeficient mouse models with different disease profiles by in vivo infection with the same clinical isolate of enterovirus 71. *Journal of virology*, 88(21), 12485–12499. <https://doi.org/10.1128/JVI.00692-14>
- 38- Chen, Y. C., Yu, C. K., Wang, Y. F., Liu, C. C., Su, I. J., & Lei, H. Y. (2004). A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement. *The Journal of general virology*, 85(Pt 1), 69–77. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19423-0>
- 39- Zhou, Y., Zhou, C., Wang, K., Qiu, Q., Cheng, Y., Li, Y., Cui, P., Liang, L., Li, P., Deng, X., Wang, L., Zheng, W., Gong, H., Wang, F., Xu, M., Chu, J. J. H., Turtle, L., & Yu, H. (2023). Diagnostic performance of different specimens in detecting enterovirus A71 in children with hand, foot and mouth disease. *Virologica Sinica*, 38(2), 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.11.004>
- 40- Ooi, M. H., Solomon, T., Podin, Y., Mohan, A., Akin, W., Yusuf, M. A., del Sel, S., Kontol, K. M., Lai, B. F., Clear, D., Chieng, C. H., Blake, E., Perera, D., Wong, S. C., & Cardoso, J. (2007). Evaluation of different clinical sample types in diagnosis of human enterovirus 71-associated hand-foot-and-mouth disease. *Journal of clinical microbiology*, 45(6), 1858–1866. <https://doi.org/10.1128/JCM.01394-06>
- 41- Min, N., Sakthi Vale, P. D., Wong, A. A., Tan, N. W. H., Chong, C. Y., Chen, C. J., Wang, R. Y. L., & Chu, J. J. H. (2018). Circulating Salivary miRNA

- hsa-miR-221 as Clinically Validated Diagnostic Marker for Hand, Foot, and Mouth Disease in Pediatric Patients. *EBioMedicine*, 31, 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.05.006>
- 42- Tan, Y. W., Teo, F. M. S., Ler, S. G., Alli-Shaik, A., Nyo, M., Chong, C. Y., Tan, N. W. H., Wang, R. Y. L., Gunaratne, J., & Chu, J. J. H. (2023). Potential relevance of salivary legumain for the clinical diagnostic of hand, foot, and mouth disease. *Journal of medical virology*, 95(11), e29243. <https://doi.org/10.1002/jmv.29243>
 - 43- Barauna, V. G., Singh, M. N., Barbosa, L. L., Marcarini, W. D., Vassallo, P. F., Mill, J. G., Ribeiro-Rodrigues, R., Campos, L. C. G., Warnke, P. H., & Martin, F. L. (2021). Ultrarapid On-Site Detection of SARS-CoV-2 Infection Using Simple ATR-FTIR Spectroscopy and an Analysis Algorithm: High Sensitivity and Specificity. *Analytical chemistry*, 93(5), 2950–2958. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04608>
 - 44- Sitole, L., Steffens, F., Krüger, T. P., & Meyer, D. (2014). Mid-ATR-FTIR spectroscopic profiling of HIV/AIDS sera for novel systems diagnostics in global health. *Omics: a journal of integrative biology*, 18(8), 513–523. <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0157>
 - 45- Santos, M. C. D.; Nascimento, Y. M.; Monteiro, J. D.; Alves, B. E. B.; Melo, M. F.; Paiva, A. A. P.; Pereira, H. W. B.; Medeiros, L. G.; Moraes, I. C.; Fagundes Neto, J. C.; et al. ATRFTIR Spectroscopy with Chemometric Algorithms of Multivariate Classification in the Discrimination between Healthy vs. dengue vs. chikungunya vs. zika Clinical Samples. *Anal. Methods* 2018, 10, 1280–1285. doi:10.1039/C7AY02784B.
 - 46- Mustafa, F. H., Ismail, I., Ahmad Munawar, A. A. Z., Abdul Basir, B., Shueb, R. H., Irekeola, A. A., Wan Ismail, W. Z., Jamaludin, J., Balakrishnan, S. R., Sahrim, M., & Yusof, N. Y. (2023). A review on current diagnostic tools and potential optical absorption spectroscopy for HFMD detection. *Analytical biochemistry*, 683, 115368. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115368>
 - 47- Kingston, N. J., Grehan, K., Snowden, J. S., Shegdar, M., Fox, H., Macadam, A. J., Rowlands, D. J., & Stonehouse, N. J. (2022). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of the Native Conformation of Enterovirus A71. *mSphere*, 7(3), e0008822. <https://doi.org/10.1128/msphere.00088-22>

- 48- Oliveira, S. W., Cardoso-Sousa, L., Georjutti, R. P., Shimizu, J. F., Silva, S., Caixeta, D. C., Guevara-Vega, M., Cunha, T. M., Carneiro, M. G., Goulart, L. R., Jardim, A. C. G., & Sabino-Silva, R. (2023). Salivary Detection of Zika Virus Infection Using ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Machine Learning Algorithms and Univariate Analysis: A Proof-of-Concept Animal Study. *Diagnostics* (Basel, Switzerland), 13(8), 1443. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081443>

Acknowledgments

We would like to thank our collaborators at the Laboratory of Virology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

Author contributions

D. C. T. A. and R.S.S. conceived and designed the experiments; D. C. T. A., M.G.V. and C. M. A. performed the experiments; M.G.V., D.C.C and M.G.C. analyzed the data; A.C.G., I. A. S. and S. F. L. contributed with reagents/materials/analysis tools; D. C. T. A. and R.S.S. wrote the paper; R.S.S. suggestion for research design.

Funding

CAPES - Prevention and Combat of Outbreaks, Endemics, Epidemics, and Pandemics (#23038.014934/2020-59), FAPEMIG (#APQ-02872-16, APQ-03613-17, APQ-00476-20, APQ-02148-21), Federal University of Uberlandia and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology (CNPq Process N.: 465669/2014-0, 403193/2022-2). Alves, DCT received a fellowship from PROEX/CAPES (Process N.: 88887.639816/2021-00). Sabino-Silva, R received a fellowship from FAU/UFU, CNPq productivity fellowship (306050/2021-8), and PrInt CAPES/UFU

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

REFERÊNCIAS

- 1- Lee TC, Guo HR, Su HJJ, Yang YC, Chang HL, Chen KT. Diseases Caused by Enterovirus 71 Infection. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2009 Oct;28(10):904–10.
- 2- Brown BA, Pallansch MA. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. *Virus Research*. 1995 Dec;39(2-3):195–205.
- 3- Shimizu JF, Feferbaum-Leite S, Santos IA, Martins DR, Kingston NJ, Shegdar M, et al. Effect of proteins isolated from Brazilian snakes on enterovirus A71 replication cycle: An approach against hand, foot and mouth disease. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023 Jun 1;241:124519–9.
- 4- Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *The Journal of infectious diseases* [Internet]. 1974 [cited 2019 Nov 12];129(3):304–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4361245>
- 5- Yuan J, Shen L, Wu J, Zou X, Gu J, Chen J, et al. Enterovirus A71 Proteins: Structure and Function. *Frontiers in Microbiology*. 2018 Feb 21;9.
- 6- Huang PJ, Shih S. Update on enterovirus 71 infection. *Current Opinion in Virology*. 2014 Apr 1;5:98–104.
- 7- Yi EJ, Shin YJ, Kim JH, Kim TG, Chang SY. Enterovirus 71 infection and vaccines. *Clinical and Experimental Vaccine Research* [Internet]. 2017 Jan 1;6(1):4–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5292356/>
- 8- Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardoso MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *The Lancet Infectious Diseases*. 2010 Nov;10(11):778–90.
- 9- Shih SR, Stollar V, Li ML. Host Factors in Enterovirus 71 Replication. *Journal of Virology*. 2011 Jun 29;85(19):9658–66
- 10- Esposito S, Principi N. Hand, foot and mouth disease: current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2018 Feb 6;37(3):391–8.

- 11-Zhang W, Huang Z, Huang M, Zeng J. Predicting Severe Enterovirus 71-Infected Hand, Foot, and Mouth Disease: Cytokines and Chemokines. Mediators of Inflammation [Internet]. 2020 Jan 31 [cited 2023 Jan 16];2020:e9273241. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2020/9273241/>
- 12-Saguil, A., Kane, S. F., Lauters, R., & Mercado, M. G. (2019). Hand-Foot-and-Mouth Disease: Rapid Evidence Review. *American family physician*, 100(7), 408–414.
- 13-Ventarola, D., Bordone, L., & Silverberg, N. (2015). Update on hand-foot-and-mouth disease. *Clinics in dermatology*, 33(3), 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.12.011>
- 14-Yin, X. G., Yi, H. X., Shu, J., Wang, X. J., Wu, X. J., & Yu, L. H. (2014). Clinical and epidemiological characteristics of adult hand, foot, and mouth disease in northern Zhejiang, China, May 2008-November 2013. *BMC infectious diseases*, 14, 251. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-251>
- 15-Hamaguchi, T., Fujisawa, H., Sakai, K., Okino, S., Kurosaki, N., Nishimura, Y., Shimizu, H., & Yamada, M. (2008). Acute encephalitis caused by intrafamilial transmission of enterovirus 71 in adult. *Emerging infectious diseases*, 14(5), 828–830. <https://doi.org/10.3201/eid1405.071121>
- 16-Chan, K. P., Goh, K. T., Chong, C. Y., Teo, E. S., Lau, G., & Ling, A. E. (2003). Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore. *Emerging infectious diseases*, 9(1), 78–85. <https://doi.org/10.3201/eid0901.020112>
- 17-Chen, K. T., Chang, H. L., Wang, S. T., Cheng, Y. T., & Yang, J. Y. (2007). Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998-2005. *Pediatrics*, 120(2), e244–e252. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-3331>
- 18-Li, W., Gao, H., Zhang, Q. *et al.* Large outbreak of herpangina in children caused by enterovirus in summer of 2015 in Hangzhou, China. *Sci Rep* 6, 35388 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep35388>
- 19-Omaña-Cepeda, C., Martínez-Valverde, A., del Mar Sabater-Recolons, M., Jané-Salas, E., Marí-Roig, A., & López-López, J. (2016). A literature review and case report of hand, foot and mouth disease in an

- immunocompetent adult. *BMC research notes*, 9, 165.
<https://doi.org/10.1186/s13104-016-1973-y>
- 20-Fang, Y., Wang, S., Zhang, L., Guo, Z., Huang, Z., Tu, C., & Zhu, B. P. (2014). Risk factors of severe hand, foot and mouth disease: a meta-analysis. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 46(7), 515–522.
<https://doi.org/10.3109/00365548.2014.907929>
- 21-Chen, Y. F., Hu, L., Xu, F., Liu, C. J., & Li, J. (2019). A case report of a teenager with severe hand, foot, and mouth disease with brainstem encephalitis caused by enterovirus 71. *BMC pediatrics*, 19(1), 59.
<https://doi.org/10.1186/s12887-019-1428-4>
- 22-Ślebioda, Z., & Dorocka-Bobkowska, B. (2018). Hand, foot and mouth disease as an emerging public health problem: Case report of familial child-to-adult transmission. *Dental and medical problems*, 55(1), 99–104.
<https://doi.org/10.17219/dmp/80995>
- 23-World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific. (2011). A guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth disease (HFMD). WHO Regional Office for the Western Pacific. <https://iris.who.int/handle/10665/207490>. Acesso em: 15 dez 2023.
- 24-Carmo, R. L. D., Alves Simão, A. K., Amaral, L. L. F. D., Inada, B. S. Y., Silveira, C. F., Campos, C. M. S., Freitas, L. F., Bonadio, V., & Marussi, V. H. R. (2019). Neuroimaging of Emergent and Reemergent Infections. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 39(6), 1649–1671.
<https://doi.org/10.1148/rq.2019190020>
- 25-Chang, P. C., Chen, S. C., & Chen, K. T. (2016). The Current Status of the Disease Caused by Enterovirus 71 Infections: Epidemiology, Pathogenesis, Molecular Epidemiology, and Vaccine Development. *International journal of environmental research and public health*, 13(9), 890. <https://doi.org/10.3390/ijerph13090890>
- 26-Ma, E., Lam, T., Wong, C., & Chuang, S. K. (2010). Is hand, foot and mouth disease associated with meteorological parameters?. *Epidemiology and infection*, 138(12), 1779–1788.
<https://doi.org/10.1017/S0950268810002256>

- 27-Wang, Y., Feng, Z., Yang, Y., Self, S., Gao, Y., Longini, I. M., Wakefield, J., Zhang, J., Wang, L., Chen, X., Yao, L., Stanaway, J. D., Wang, Z., & Yang, W. (2011). Hand, foot, and mouth disease in China: patterns of spread and transmissibility. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 22(6), 781–792. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e318231d67a>
- 28-Zeng, M., Li, Y. F., Wang, X. H., Lu, G. P., Shen, H. G., Yu, H., & Zhu, Q. R. (2012). Epidemiology of hand, foot, and mouth disease in children in Shanghai 2007-2010. *Epidemiology and infection*, 140(6), 1122–1130. <https://doi.org/10.1017/S0950268811001622>
- 29-Yan, X. F., Gao, S., Xia, J. F., Ye, R., Yu, H., & Long, J. E. (2012). Epidemic characteristics of hand, foot, and mouth disease in Shanghai from 2009 to 2010: Enterovirus 71 subgenotype C4 as the primary causative agent and a high incidence of mixed infections with coxsackievirus A16. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 44(4), 297–305. <https://doi.org/10.3109/00365548.2011.634433>
- 30-Yen, T. Y., Shih, W. L., Huang, Y. C., Lee, J. T., Huang, L. M., & Chang, L. Y. (2018). Polymorphisms in enterovirus 71 receptors associated with susceptibility and clinical severity. *PloS one*, 13(11), e0206769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206769>
- 31-Chakraborty, R., Iturriza-Gómara, M., Musoke, R., Palakudy, T., D'Agostino, A., & Gray, J. (2004). An epidemic of enterovirus 71 infection among HIV-1-infected orphans in Nairobi. *AIDS (London, England)*, 18(14), 1968–1970. <https://doi.org/10.1097/00002030-200409240-00018>
- 32-Huaman, J. L., Carrion, G., Ampuero, J. S., Ocaña, V., Laguna-Torres, V. A., & Hontz, R. D. (2016). Enterovirus-71 genotype C isolated in Peru between 2006 and 2009. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 85, 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.10.023>
- 33-Oyero, O. G., & Adu, F. D. (2010). Non-polio enteroviruses serotypes circulating in Nigeria. *African journal of medicine and medical sciences*, 39 Suppl, 201–208.

- 34-Akhmadishina, L. V., Ereemeeva, T. P., Trotsenko, O. E., Ivanova, O. E., Mikhailov, M. I., & Lukashev, A. N. (2014). Seroepidemiology and molecular epidemiology of enterovirus 71 in Russia. *PloS one*, 9(5), e97404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097404>
- 35-Machain-Williams, C., Dzul-Rosado, A. R., Yeh-Gorocica, A. B., Rodriguez-Ruz, K. G., Noh-Pech, H., Talavera-Aguilar, L., Salazar, M. I., Castro-Mussot, M. E., Reyes-Solis, G., Garcia-Rejon, J. E., Puerto-Manzano, F. I., & Blitvich, B. J. (2014). Detection of hand, foot and mouth disease in the yucatan peninsula of Mexico. *Infectious disease reports*, 6(4), 5627. <https://doi.org/10.4081/idr.2014.5627>
- 36-Kehle, J., Roth, B., Metzger, C., Pfitzner, A., & Enders, G. (2003). Molecular characterization of an Enterovirus 71 causing neurological disease in Germany. *Journal of neurovirology*, 9(1), 126–128. <https://doi.org/10.1080/13550280390173364>
- 37-Chang L, Tsao K, Hsia S, et al. Transmission and Clinical Features of Enterovirus 71 Infections in Household Contacts in Taiwan. *JAMA*. 2004;291(2):222–227. doi:10.1001/jama.291.2.222
- 38-Wong, S. S., Yip, C. C., Lau, S. K., & Yuen, K. Y. (2010). Human enterovirus 71 and hand, foot and mouth disease. *Epidemiology and infection*, 138(8), 1071–1089. <https://doi.org/10.1017/S0950268809991555>
- 39-Chung, P. W., Huang, Y. C., Chang, L. Y., Lin, T. Y., & Ning, H. C. (2001). Duration of enterovirus shedding in stool. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 34(3), 167–170.
- 40-Chang, L. Y., Lin, T. Y., Huang, Y. C., Tsao, K. C., Shih, S. R., Kuo, M. L., Ning, H. C., Chung, P. W., & Kang, C. M. (1999). Comparison of enterovirus 71 and coxsackie-virus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998. *The Pediatric infectious disease journal*, 18(12), 1092–1096. <https://doi.org/10.1097/00006454-199912000-00013>
- 41-Chang L. Y. (2008). Enterovirus 71 in Taiwan. *Pediatrics and neonatology*, 49(4), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S1875-9572\(08\)60023-6](https://doi.org/10.1016/S1875-9572(08)60023-6)

- 42-Liu, Y., Xi, Y., Ji, L., Shen, Q., Zhang, W., & Xue, M. (2023). Antiviral drugs (synthetic small molecule inhibitors and nature drugs) against EV71 in enteroviruses: Advances and Perspectives. *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*, 100099.
- 43-Li, X. W., Ni, X., Qian, S. Y., Wang, Q., Jiang, R. M., Xu, W. B., Zhang, Y. C., Yu, G. J., Chen, Q., Shang, Y. X., Zhao, C. S., Yu, H., Zhang, T., Liu, G., Deng, H. L., Gao, J., Ran, X. G., Yang, Q. Z., Xu, B. L., Huang, X. Y., Yang, T. (2018). Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of hand, foot and mouth disease (2018 edition). *World journal of pediatrics : WJP*, 14(5), 437–447. <https://doi.org/10.1007/s12519-018-0189-8>
- 44-Wei, Y., Hu, D., Li, D., Hu, K., Zhang, Q., Liu, H., He, Q., Yao, C., Li, H., & Wang, J. (2023). Antiviral effects and mechanisms against EV71 of the novel 2-benzoxyl-phenylpyridine derivatives. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 186, 106445. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106445>
- 45-Earley, D. F., Bailly, B., Maggioni, A., Kundur, A. R., Thomson, R. J., Chang, C. W., & von Itzstein, M. (2019). Efficient Blocking of Enterovirus 71 Infection by Heparan Sulfate Analogues Acting as Decoy Receptors. *ACS infectious diseases*, 5(10), 1708–1717. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00070>
- 46-Mu, Z., Wang, B., Zhang, X., Gao, X., Qin, B., Zhao, Z., & Cui, S. (2013). Crystal structure of 2A proteinase from hand, foot and mouth disease virus. *Journal of molecular biology*, 425(22), 4530–4543. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.08.016>
- 47-Pei, Z., Wang, H., Zhao, Z., Chen, X., Huan, C., & Zhang, W. (2022). Chemokine PF4 inhibits EV71 and CA16 infections at the entry stage. *Journal of Virology*, 96(11), e00435-22.
- 48-Wang, J., Fan, T., Yao, X., Wu, Z., Guo, L., Lei, X., Wang, J., Wang, M., Jin, Q., & Cui, S. (2011). Crystal structures of enterovirus 71 3C protease complexed with rupintrivir reveal the roles of catalytically important residues. *Journal of virology*, 85(19), 10021–10030. <https://doi.org/10.1128/JVI.05107-11>

- 49-Zhao, H., Jiao, W., Xiu, Y., Zhou, K., Zhong, P., Wang, N., & Yu, S. (2022). Enzymatic Biotransformation of Gypenoside XLIX into Gylongiposide I and Their Antiviral Roles against Enterovirus 71 In Vitro. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(13), 4094. <https://doi.org/10.3390/molecules27134094>
- 50-Zeng, X., Zhang, P., Wang, Y., Qin, C., Chen, S., He, W., Tao, L., Tan, Y., Gao, D., Wang, B., Chen, Z., Chen, W., Jiang, Y. Y., & Chen, Y. Z. (2019). CMAUP: a database of collective molecular activities of useful plants. *Nucleic acids research*, 47(D1), D1118–D1127. <https://doi.org/10.1093/nar/gky965>
- 51-Zhang, X., Zhang, Y., Li, H., & Liu, L. (2022). Hand-Foot-and-Mouth Disease-Associated Enterovirus and the Development of Multivalent HFMD Vaccines. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 169. <https://doi.org/10.3390/ijms24010169>
- 52-Zhu, P., Ji, W., Li, D., Li, Z., Chen, Y., Dai, B., Han, S., Chen, S., Jin, Y., & Duan, G. (2023). Current status of hand-foot-and-mouth disease. *Journal of biomedical science*, 30(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00908-4>
- 53-Bello, A. M., & Roshorm, Y. M. (2022). Recent progress and advances towards developing enterovirus 71 vaccines for effective protection against human hand, foot and mouth disease (HFMD). *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 79, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2022.08.007>
- 54-Head, J. R., Collender, P. A., Lewnard, J. A., Skaff, N. K., Li, L., Cheng, Q., Baker, J. M., Li, C., Chen, D., Ohringer, A., Liang, S., Yang, C., Hubbard, A., Lopman, B., & Remais, J. V. (2020). Early Evidence of Inactivated Enterovirus 71 Vaccine Impact Against Hand, Foot, and Mouth Disease in a Major Center of Ongoing Transmission in China, 2011-2018: A Longitudinal Surveillance Study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(12), 3088–3095. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1188>
- 55-Guan, X., Che, Y., Wei, S., Li, S., Zhao, Z., Tong, Y., Wang, L., Gong, W., Zhang, Y., Zhao, Y., Wu, Y., Wang, S., Jiang, R., Huang, J., Liu, Y., Luo, W., Liao, Y., Hu, X., Zhang, W., Dai, Y., ... Li, Q. (2020). Effectiveness and

- Safety of an Inactivated Enterovirus 71 Vaccine in Children Aged 6-71 Months in a Phase IV Study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(9), 2421–2427. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1114>
- 56-Zhu, F. C., Meng, F. Y., Li, J. X., Li, X. L., Mao, Q. Y., Tao, H., Zhang, Y. T., Yao, X., Chu, K., Chen, Q. H., Hu, Y. M., Wu, X., Liu, P., Zhu, L. Y., Gao, F., Jin, H., Chen, Y. J., Dong, Y. Y., Liang, Y. C., Shi, N. M., ... Shen, X. L. (2013). Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 381(9882), 2024–2032. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61049-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61049-1)
- 57-Zhu, F., Xu, W., Xia, J., Liang, Z., Liu, Y., Zhang, X., Tan, X., Wang, L., Mao, Q., Wu, J., Hu, Y., Ji, T., Song, L., Liang, Q., Zhang, B., Gao, Q., Li, J., Wang, S., Hu, Y., Gu, S., ... Wang, N. (2014). Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China. *The New England journal of medicine*, 370(9), 818–828. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304923>
- 58-Li, R., Liu, L., Mo, Z., Wang, X., Xia, J., Liang, Z., Zhang, Y., Li, Y., Mao, Q., Wang, J., Jiang, L., Dong, C., Che, Y., Huang, T., Jiang, Z., Xie, Z., Wang, L., Liao, Y., Liang, Y., Nong, Y., ... Li, Q. (2014). An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children. *The New England journal of medicine*, 370(9), 829–837. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1303224>
- 59-Huang, L. M., Chiu, C. H., Chiu, N. C., Lin, C. Y., Li, M. T., Kuo, T. Y., Weng, Y. J., Hsieh, E. F., & Tai, I. C. (2019). Immunogenicity, safety, cross-reaction, and immune persistence of an inactivated enterovirus A71 vaccine in children aged from two months to 11 years in Taiwan. *Vaccine*, 37(13), 1827–1835. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.023>
- 60-Tambyah, P. A., Oon, J., Asli, R., Kristanto, W., Hwa, S. H., Vang, F., Karwal, L., Fuchs, J., Santangelo, J. D., Gordon, G. S., Thomson, C., Rao, R., Dean, H., Das, S. C., & Stinchcomb, D. T. (2019). An inactivated enterovirus 71 vaccine is safe and immunogenic in healthy adults: A phase I, double blind, randomized, placebo-controlled, study of two

- dosages. *Vaccine*, 37(31), 4344–4353.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.023>
- 61-Lei, D., Griffiths, E., & Martin, J. (2020). WHO working group meeting to develop WHO Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines. *Vaccine*, 38(32), 4917–4923.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.05.001>
- 62-Ooi, M. H., Wong, S. C., Lewthwaite, P., Cardoso, M. J., & Solomon, T. (2010). Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *The Lancet. Neurology*, 9(11), 1097–1105. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70209-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70209-X)
- 63-Ooi, M. H., Solomon, T., Podin, Y., Mohan, A., Akin, W., Yusuf, M. A., del Sel, S., Kontol, K. M., Lai, B. F., Clear, D., Chieng, C. H., Blake, E., Perera, D., Wong, S. C., & Cardoso, J. (2007). Evaluation of different clinical sample types in diagnosis of human enterovirus 71-associated hand-foot-and-mouth disease. *Journal of clinical microbiology*, 45(6), 1858–1866.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01394-06>
- 64-Xu, F., Yan, Q., Wang, H., Niu, J., Li, L., Zhu, F., He, S., Zhang, S., Weng, Z., Cheng, T., Cai, Y., He, D., Chen, Y., Ge, S., Yeo, A. E., Zhang, J., Ng, M. H., & Xia, N. (2010). Performance of detecting IgM antibodies against enterovirus 71 for early diagnosis. *PloS one*, 5(6), e11388.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011388>
- 65-Reyes, M., Piotrowski, M., Ang, S. K., Chan, J., He, S., Chu, J. J. H., & Kah, J. C. Y. (2017). Exploiting the Anti-Aggregation of Gold Nanostars for Rapid Detection of Hand, Foot, and Mouth Disease Causing Enterovirus 71 Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Analytical chemistry*, 89(10), 5373–5381.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00066>
- 66-Zhou, Y., Zhou, C., Wang, K., Qiu, Q., Cheng, Y., Li, Y., Cui, P., Liang, L., Li, P., Deng, X., Wang, L., Zheng, W., Gong, H., Wang, F., Xu, M., Chu, J. J. H., Turtle, L., & Yu, H. (2023). Diagnostic performance of different specimens in detecting enterovirus A71 in children with hand, foot and mouth disease. *Virologica Sinica*, 38(2), 268–275.
<https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.11.004>

- 67-Carpenter G. H. (2013). The secretion, components, and properties of saliva. *Annual review of food science and technology*, 4, 267–276. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182700>
- 68-Nonaka, T., & Wong, D. T. W. (2022). Saliva Diagnostics. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)*, 15(1), 107–121. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061020-123959>
- 69-Khanna, P., & Walt, D. R. (2015). Salivary diagnostics using a portable point-of-service platform: a review. *Clinical therapeutics*, 37(3), 498–504. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.02.004>
- 70-Wong D. T. (2012). Salivary diagnostics. *Operative dentistry*, 37(6), 562–570. <https://doi.org/10.2341/12-143-BL>
- 71-Adeoye, J., Brennan, P. A., & Thomson, P. (2020). "Search less, verify more"-Reviewing salivary biomarkers in oral cancer detection. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 49(8), 711–719. <https://doi.org/10.1111/jop.13003>
- 72-Gao, X., Jiang, S., Koh, D., & Hsu, C. Y. (2016). Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontology* 2000, 70(1), 128–141. <https://doi.org/10.1111/prd.12100>
- 73-Jung, J. Y., Kim, J. W., Kim, H. A., & Suh, C. H. (2021). Salivary Biomarkers in Patients with Sjögren's Syndrome-A Systematic Review. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12903. <https://doi.org/10.3390/ijms222312903>
- 74-Liang, D., & Lu, H. (2019). Salivary biological biomarkers for Alzheimer's disease. *Archives of oral biology*, 105, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.06.004>
- 75-Min, N., Sakthi Vale, P. D., Wong, A. A., Tan, N. W. H., Chong, C. Y., Chen, C. J., Wang, R. Y. L., & Chu, J. J. H. (2018). Circulating Salivary miRNA hsa-miR-221 as Clinically Validated Diagnostic Marker for Hand, Foot, and Mouth Disease in Pediatric Patients. *EBioMedicine*, 31, 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.05.006>
- 76-Tan, Y. W., Teo, F. M. S., Ler, S. G., Alli-Shaik, A., Nyo, M., Chong, C. Y., Tan, N. W. H., Wang, R. Y. L., Gunaratne, J., & Chu, J. J. H. (2023). Potential relevance of salivary legumain for the clinical diagnostic of hand,

- foot, and mouth disease. *Journal of medical virology*, 95(11), e29243.
<https://doi.org/10.1002/jmv.29243>
- 77-Slowey, P. D. (2016). *Salivary Diagnostics Using Purified Nucleic Acids. Oral Biology*, 3–15. doi:10.1007/978-1-4939-6685-1_1
- 78-Naseer, K., Ali, S., & Qazi, J. (2021). ATR-FTIR spectroscopy as the future of diagnostics: a systematic review of the approach using bio-fluids. *Applied Spectroscopy Reviews*, 56(2), 85-97.
- 79-Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Fielden, P. R., Fogarty, S. W., Fullwood, N. J., Heys, K. A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch, P. L., Obinaju, B., Sockalingum, G. D., Sulé-Suso, J., Strong, R. J., Walsh, M. J., Wood, B. R., Gardner, P., ... Martin, F. L. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature protocols*, 9(8), 1771–1791.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>
- 80-Elkins K. M. (2011). Rapid presumptive "fingerprinting" of body fluids and materials by ATR FT-IR spectroscopy. *Journal of forensic sciences*, 56(6), 1580–1587. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01870.x>
- 81-Ferreira, I. C. C., Aguiar, E. M. G., Silva, A. T. F., Santos, L. L. D., Cardoso-Sousa, L., Araújo, T. G., Santos, D. W., Goulart, L. R., Sabino-Silva, R., & Maia, Y. C. P. (2020). Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *Journal of oncology*, 2020, 4343590.
<https://doi.org/10.1155/2020/4343590>
- 82-Caixeta DC, Carneiro MG, Rodrigues R, Alves DCT, Goulart LR, Cunha TM, Espindola FS, Vitorino R, Sabino-Silva R. Salivary ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Support Vector Machine Classification for Screening of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Apr 12;13(8):1396. doi: 10.3390/diagnostics13081396. PMID: 37189497; PMCID: PMC10137088.
- 83-Delrue, C., De Bruyne, S., & Speeckaert, M. M. (2023). Unlocking the Diagnostic Potential of Saliva: A Comprehensive Review of Infrared Spectroscopy and Its Applications in Salivary Analysis. *Journal of personalized medicine*, 13(6), 907. <https://doi.org/10.3390/jpm13060907>

- 84-Wang, R., & Wang, Y. (2021). Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Oral Cancer Diagnosis. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1206. <https://doi.org/10.3390/ijms22031206>
- 85-Martinez-Cuazitl, A., Vazquez-Zapien, G. J., Sanchez-Brito, M., Limon-Pacheco, J. H., Guerrero-Ruiz, M., Garibay-Gonzalez, F., Delgado-Macuil, R. J., de Jesus, M. G. G., Corona-Perezgrovas, M. A., Pereyra-Talamantes, A., & Mata-Miranda, M. M. (2021). ATR-FTIR spectrum analysis of saliva samples from COVID-19 positive patients. *Scientific reports*, 11(1), 19980. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99529-w>
- 86-Rodrigues, R. P., Aguiar, E. M., Cardoso-Sousa, L., Caixeta, D. C., Guedes, C. C., Siqueira, W. L., Maia, Y. C. P., Cardoso, S. V., & Sabino-Silva, R. (2019). Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. *Brazilian dental journal*, 30(5), 437–445. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902228>
- 87-Mustafa, F. H., Ismail, I., Ahmad Munawar, A. A. Z., Abdul Basir, B., Shueb, R. H., Irekeola, A. A., Wan Ismail, W. Z., Jamaludin, J., Balakrishnan, S. R., Sahrim, M., & Yusof, N. Y. (2023). A review on current diagnostic tools and potential optical absorption spectroscopy for HFMD detection. *Analytical biochemistry*, 683, 115368. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.11536>