UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação
MESTRADO PROFISSIONAL
TECNOLOGIA EM QUÍMICA E BIOQUÍMICA

JOYCE SUELLEN COELHO PIRES

**Desenvolvimento de produto multiparamétrico para
triagem pré-natal de anticorpos IgG contra doenças
infecciosas**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
03/02/2016

JOYCE SUELLEN COELHO PIRES

**Desenvolvimento de produto multiparamétrico para
triagem pré-natal de anticorpos IgG contra doenças
infecciosas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pires, Joyce Suellen Coelho

P667d Desenvolvimento de produto multiparamétrico para triagem
pré-natal de anticorpos IgG contra doenças infecciosas /
Joyce Suellen Coelho Pires. -- São Paulo, 2016.
48p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Ulrich, Alexander Henning

1. Bioquímica 2. Anticorpos 3. Imunologia 4. Doenças
infecciosas I. T. II. Ulrich, Alexander Henning, orientador.

574.192 CDD

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha mãe, Fátima, por ter me proporcionado a oportunidade de estudar e assim poder mudar minha realidade a partir do conhecimento adquirido.

Ao meu marido Rodrigo Barbosa, por todo incentivo e companheirismo, sempre.

Ao Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich, por toda orientação e compreensão.

À Intercientífica, por permitir a utilização dos dados, mesmo após meu desligamento da equipe.

À Prof. Dra. Denise Siqueira, pelo auxílio com as questões relativas à autorização para uso dos dados da Intercientífica.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a realização desse projeto.

RESUMO

PIRES, J.S.C. **Desenvolvimento de produto multiparamétrico para triagem pré-natal de anticorpos IgG contra doenças infecciosas.** 2016. 48 p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Infecção congênita é aquela transmitida da mãe ao feto antes do nascimento. A transmissão vertical pode ocorrer por via transplacentária ou por contato direto com o patógeno durante o parto. A fonte de infecção é o microrganismo presente no sangue da gestante durante a infecção primária ou crônica. Estima-se que as infecções perinatais representam 2% a 3% de todas as anomalias congênitas e as mais comuns são representadas pela sigla **TORCH**, que inclui **T**oxoplasmose, **O**utras (como sífilis e varicela-zoster), **R**ubeóla, **C**itomegalovírus e **H**erpes. A maioria das infecções TORCH causa morbidade materna leve, assintomática, mas tem consequências fetais graves e, em geral, o tratamento da infecção materna não tem impacto sobre o resultado fetal. Por isso, o reconhecimento do contágio materno e o monitoramento fetal são de extrema importância na prevenção de doenças congênitas. O presente projeto visa o desenvolvimento de um produto multiparamétrico utilizando a tecnologia xMAP®, criada pela companhia norte-americana *Luminex Corporation*, para detecção simultânea de anticorpos da classe IgG anti-Toxoplasmose, anti-Rubéola e anti-Citomegalovírus em amostras de sangue coletado em papel de filtro. O produto, inédito no mercado nacional, tem o objetivo de atender à demanda específica da triagem pré-natal no país. Como objetivos específicos pode-se citar: a melhoria da eficiência dos programas de triagem pré-natal, graças à economia de tempo, amostras e reagentes; a contribuição financeira para o Brasil, uma vez que será produzido nacionalmente, gerando emprego e renda; a possibilidade de ampliar o mercado a partir do desenvolvimento futuro de novos produtos baseados na mesma metodologia. Para tanto, utilizaram-se antígenos específicos acoplados à microesferas de poliestireno e anticorpos de detecção conjugados à estreptavidina-ficoeritrina. Foram analisadas 1499 amostras de gestantes, coletadas em papel de filtro, cedidas e previamente triadas pela APAE-Goiânia, com o objetivo de comparar os resultados obtidos através da análise com o protótipo desenvolvido com aqueles já confirmados pelo laboratório utilizando a tradicional metodologia de ELISA. Os resultados de Concordância e Sensibilidade foram superiores a 78% para todos os parâmetros. Por outro lado, os valores de Especificidade foram mais baixos, principalmente para os parâmetros Rubéola e Citomegalovírus. Importante ressaltar o pequeno número de amostras com resultado negativo para Citomegalovírus e Rubéola disponível, o que refletiu diretamente no cálculo da Especificidade do produto.

Palavras-chave: triagem pré-natal, TORCH, infecção congênita, ensaio multiparamétrico, Luminex.

ABSTRACT

PIRES, J.S.C **Development of multiplex assay for prenatal screening of IgG antibodies against infectious diseases**. 2016. 48 p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Congenital infections are transmitted from the mother to the fetus before birth. Vertical transmission can occur via placenta or by direct contact with the pathogen during childbirth. The source of infection is the microorganism present in the pregnant woman's blood during primary or chronic infection. It is estimated that perinatal infections are responsible for 2% to 3% of all congenital abnormalities and the most common are represented by the acronym TORCH, including **T**oxoplasmosis, **O**thers (such as syphilis and varicella-zoster), **R**ubella, **C**ytomegalovirus (CMV) and **H**erpes. Most infections TORCH causes mild maternal morbidity, asymptomatic, but has serious fetal consequences fetal and, generally, maternal infection treatment has no impact on fetal outcome. Therefore, the recognition of maternal infection and fetal monitoring are extremely important in preventing birth defects. This project aims to develop a product using the multiplex xMAP® technology, created by US company *Luminex Corporation*, for simultaneous detection of IgG antibodies anti-toxoplasmosis, anti-rubella and anti-cytomegalovirus in blood samples collected in filter paper. The product, unprecedented in brazilian market, aims to meet the specific demand of prenatal screening in Brazil. The specific objectives are: improving the efficiency of prenatal screening programs, thanks to savings in time, samples and reagents; the financial contribution for Brazil, as it will be produced nationally, generating jobs and income; the possibility of expanding the market from the future development of new products based on the same methodology. For this purpose, were used specific antigens coupled to polystyrene beads and antibodies conjugated to streptavidin-phycoerythrin. Were analyzed 1499 samples of pregnant women, collected on filter paper, pre-screened by APAE-Goiânia, in order to compare the results obtained from the analysis with the prototype developed with those already confirmed by the laboratory using traditional ELISA methodology. The results of Concordance and Sensitivity were higher than 78% for all parameters. In contrast, the Specificity values were lower, especially for Rubella and Cytomegalovirus parameters. Importantly the small number of negative samples negative for Cytomegalovirus and Rubella provided by APAE-Goiânia, which is directly reflected in the product specificity value.

Keywords: prenatal screening, TORCH, congenital infection, multiplex assay, Luminex.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	Triagem pré-natal na prevenção de doenças congênitas	7
1.2	Sistema imunológico	10
1.2.1	Anticorpos: aspectos moleculares e classificação	11
1.3	Infecções congênitas	15
1.3.1	Citomegalovirose	15
1.3.2	Toxoplasmose	16
1.3.3	Rubéola	20
1.4	Métodos para triagem de doenças infecciosas durante a gestação	23
2	OBJETIVO	30
3	METODOLOGIA	31
3.1	Escolha dos antígenos de captura e detector	31
3.1.1	Antígeno de captura: <i>Toxoplasma gondii</i> antigen grade III	32
3.1.2	Antígeno de captura: Rubella virus grade IV	32
3.1.3	Antígenos de captura: Cytomegalo Virus Pp52 (UL44) Recombinant & Cytomegalo Virus Pp150 (UL32) Recombinant	33
3.1.4	Detector: PE-IgG conjugate, goat anti-human IgG F(ab), Fc specific	33
3.2	Acoplamento	34
3.2.1	Protocolo de ensaio padrão	35
3.3	Otimização	35
3.4	Avaliação da reprodutibilidade	36
3.5	Determinação do <i>cut-off</i>	36
3.6	Testes com amostras reais	37
3.7	Comparativo	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
	ANEXO	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Triagem pré-natal na prevenção de doenças congênitas

A relação entre doenças em recém-nascidos e a colonização materna por uma vasta gama de microrganismos patogênicos vem sendo estudada há diversos anos. Desde 1941, ano em que os estudos do oftalmologista australiano Norman McAlister Gregg levaram à conclusão de que o contágio da Rubéola no início da gravidez está relacionado à ocorrência de catarata em recém-nascidos, o interesse nas infecções intrauterinas tem aumentado, bem como a atenção ao seu diagnóstico, prevenção e tratamento (MADI et al., 2010).

Entende-se por **infecção congênita** aquela que é transmitida da mãe ao feto antes do nascimento. A transmissão vertical pode ocorrer por via transplacentária ou por contato direto com o patógeno durante o parto. A fonte de infecção é o microrganismo presente no sangue da gestante durante a infecção primária ou crônica (GARCÍA-BERMEJO; ORY-MANCHÓN, 2015).

Estima-se que as infecções perinatais representam 2% a 3% de todas as anomalias congênitas e as mais comuns são representadas pela sigla **TORCH**, que inclui **T**oxoplasmose, **O**utras (tais como sífilis e varicela-zoster - vírus responsável pela doença popularmente conhecida como catapora), **R**ubeóla, **C**itomegalovírus (CMV) e **H**erpes. A maioria das infecções TORCH causa morbidade materna leve, assintomática, mas tem consequências fetais graves e, em geral, o tratamento da infecção materna não tem impacto sobre o resultado fetal (STEGMANN; CAREY, 2002). Por isso, o reconhecimento do contágio materno e o monitoramento fetal são de extrema importância na prevenção de doenças congênitas.

A realização do diagnóstico sorológico durante a gestação permite detectar as mulheres suscetíveis a uma infecção primária como também aquelas já infectadas. Em ambos os casos, o estudo sorológico permite adotar medidas específicas que previnem a transmissão materno-fetal de cada microrganismo (GARCÍA-BERMEJO; ORY-MANCHÓN, 2015).

Nesse contexto, inserem-se os protocolos de triagem pré-natal de doenças infecciosas em gestantes, os quais incluem a investigação da presença de anticorpos contra antígenos com elevado potencial de desenvolvimento de doenças congênitas.

No Brasil, a detecção de anticorpos da classe IgG para doenças infecciosas tais como Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovirose está inclusa em alguns Programas Estaduais de Triagem Pré-Natal, que buscam atuar na prevenção da transmissão vertical destas doenças, com destaque para o Programa Estadual de Proteção à Gestante do Mato Grosso do Sul, instituído em 2002. Nesses programas, amostras de sangue obtidas de punção anelar são coletadas em papel de filtro e encaminhadas ao laboratório responsável pelos exames de triagem. Além do diagnóstico laboratorial, os programas de proteção gestacional também proporcionam acompanhamento e tratamento médico, psicológico, nutricional e de assistência social às gestantes com resultados de exames alterados (APAE CAMPO GRANDE, 2015).

O uso do papel de filtro para coleta e análise de sangue humano data do final dos anos 60, quando Dr. Robert Guthrie (1916-1995) usou amostras de sangue seco para medir fenilalanina em recém-nascidos, com o objetivo de detectar a doença genética fenilcetonúria. Desde então, o papel de filtro vem sendo utilizado em saúde pública, como é o caso da triagem de doenças infecciosas em gestantes. Produzido

a partir de algodão puro, o papel de filtro apresenta acurada absorção das amostras de sangue e, em diversos casos, atinge o mesmo nível de precisão e reprodutibilidade encontrado em outros métodos padrão para coleta de sangue, como tubos de coleta à vácuo (MEI et al., 2001). O uso da tecnologia de imobilização de amostra de sangue em papel de filtro é um método barato e conveniente para coletar, armazenar, transportar e conservar, por longos períodos, amostras de sangue para serem utilizadas em estudos populacionais e programas de triagem sorológica, já que dispensa o uso de equipamentos como centrífuga ou refrigerador.

Figura 1 – Coleta de sangue em papel de filtro. Fonte: www.rj.gov.br

Graças ao uso deste método de imobilização de amostra, tem-se conseguido boas coberturas e, por conseguinte, o diagnóstico de doenças congênitas, o que possibilita a diminuição ou eliminação das sequelas associadas a cada uma, aspecto fundamental quando se fala em programas de saúde preventiva (GÓMÉZ et al., 2010).

1.2 Sistema imunológico

Segundo Abbas et al. (2012), **imunidade** é definida como a resistência a doenças, mais especificamente às doenças infecciosas. Em linhas gerais, o conjunto de células, tecidos e moléculas que medeiam a resistência às infecções é chamado de **sistema imunológico**, e a reação coordenada dessas células e moléculas aos microrganismos infecciosos é conhecida como resposta imunológica. No entanto, a compreensão moderna da imunologia a define como o estudo dos eventos celulares e moleculares que ocorrem após um organismo entrar em contato com microrganismos e/ou outras macromoléculas estranhas (como proteínas e polissacarídeos). Em algumas situações, até mesmo moléculas próprias podem desencadear respostas imunológicas – as chamadas respostas autoimunes.

O sistema imunológico é de suma importância para a saúde e sua atuação engloba desde a defesa contra microrganismos invasores, passando pela resposta imunológica desencadeada pela imunização passiva (vacinação), até a principal barreira para o sucesso de transplantes.

A imunidade é amplamente definida entre inata e adquirida. A **imunidade inata** (também denominada natural ou nativa) consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que agem prontamente no caso de uma infecção. Seus principais componentes são: (1) barreiras físicas e químicas, tais como os epitélios e substâncias antimicrobianas produzidas em sua superfície; (2) células fagocitárias (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas e células *natural killer* (NK); (3) hemocomponentes, incluindo sistema complemento; (4) citocinas – proteínas que atuam na regulação e coordenação das atividades das células da imunidade natural.

A resposta imunológica desencadeada pela exposição a agentes infecciosos é denominada **imunidade adquirida** (adaptativa ou específica). Trata-se de uma

resposta com alta especificidade, capaz de distinguir microrganismos e moléculas diferentes e até mesmo aqueles estritamente relacionados. Seus principais componentes são os **linfócitos B e T**, produzidos na medula óssea. Os linfócitos B são responsáveis pela secreção de anticorpos, os quais reconhecem as substâncias estranhas que induzem a resposta imunológica específica, denominadas **antígenos**. Os linfócitos T referem-se àqueles que sofrem maturação no timo e apresentam como principais subtipos os linfócitos T CD4+ auxiliares e T CD8+ citotóxicos.

Devido à diferença funcional e fenotípica entre os linfócitos B e T, a imunidade adquirida pode ser classificada em dois tipos: a **imunidade celular**, mediada por linfócitos T que reconhecem microrganismos intracelulares e destroem as células infectadas; e a **imunidade humoral**, mediada por anticorpos.

Anticorpos – ou imunoglobulinas - são glicoproteínas especializadas, produzidas e secretadas pelos linfócitos B, capazes de reconhecer antígenos microbianos, neutralizá-los e eliminá-los através de diversos mecanismos efetores.

Indivíduos podem ser imunes a um determinado antígeno tanto por imunização ativa quanto passiva. A **imunização ativa** é induzida pela exposição ao antígeno. Já a **imunização passiva** pode ser conferida a um indivíduo pela transferência de soro ou linfócitos de outro indivíduo especificamente imunizado, ou seja, sem necessidade de exposição prévia ao antígeno.

1.2.1 Anticorpos: aspectos moleculares e classificação

As moléculas de anticorpos são compostas por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas, constituídas por cerca de 110 resíduos de aminoácidos cada (Figura 2). Cada cadeia é composta por uma região

aminoterminal variável (V), que participa do reconhecimento de antígenos, e uma região carboxiterminal constante (C). Nas cadeias pesadas, a porção constante participa das funções efetoras das moléculas de anticorpos.

Figura 2 – Estrutura molecular dos anticorpos. Fonte: Abbas et al., 2012.

A região V de uma cadeia pesada (V_H) e a região V de uma cadeia leve (V_L) constituem o sítio de ligação ao antígeno (Figura 2).

A afinidade de ligação entre antígeno e anticorpo é expressa por sua constante de dissociação (K_d). A maioria dos anticorpos produzidos em uma resposta imunológica primária – ou seja, derivada da primeira exposição ao antígeno – possui K_d entre 10^{-6} e 10^{-9} M. Porém, em uma resposta imunológica secundária, na qual atuam os linfócitos B de memória, a afinidade aumenta para uma K_d entre 10^{-8} e 10^{-11} M (ABBAS et al., 2012). Uma vez que quanto menor a constante de dissociação, maior a afinidade de ligação, conclui-se que a ligação entre antígeno e anticorpo é bastante estável.

Com base nas diferenças entre as sequências de aminoácidos presentes em suas cadeias pesadas, as moléculas de anticorpos podem ser divididas em diferentes classes, denominadas **isótipos**: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Diferentes isótipos realizam diferentes funções efetoras, já que estas são mediadas pela ligação da região C da cadeia pesada a receptores Fc nas células do sistema imunológico, tais como fagócitos, células NK e mastócitos. O comparativo geral entre os diferentes isótipos pode ser verificado na Tabela 1.

Tabela 1 – Isótipos dos anticorpos humano

Isótipo do Anticorpo	Subtipos (Cadeia H)	Concentração Sérica (mg/mL)	Meia-vida Sérica (dias)	Forma Secretada	Funções
IgA	IgA1,2 (α1 ou α2)	3,5	6	IgA (dímero) Monômero, dímero, trímero	Imunidade de mucosa
IgD	Nenhum (δ)	Traço	3	Nenhuma	Receptor de antígeno do linfócito B virgem
IgE	Nenhum (ε)	0,05	2	IgE Monômero	Defesa contra parasitas helmintos, hipersensibilidade imediata
IgG	IgG1-4 (γ1, γ2, γ3 ou γ4)	13,5	23	IgG1 Monômero	Opsonização, ativação do sistema complemento, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo, imunidade neonatal, autoinibição do linfócito B
IgM	Nenhum (μ)	1,5	5	IgM Pentâmero	Receptor de antígeno do linfócito B virgem, ativação do sistema complemento

Fonte: Abbas et al., 2012.

A secreção de anticorpos se dá por meio da diferenciação de células B em plasmócitos secretores. Basicamente, o processo de diferenciação ocorre devido à proliferação em resposta ao antígeno e envolve grandes alterações estruturais, especialmente dos componentes do retículo endoplasmático – que se torna

proeminente – e da via de excreção com aumento da produção de imunoglobulinas (Ig).

Algumas células B ativadas por antígeno adquirem a capacidade de sobreviver por longos períodos e de responder rapidamente quando são novamente expostas ao antígeno responsável por sua ativação. Essas são as chamadas células de memória imunológica e atuam na resposta imune secundária, exibem receptores antigênicos com alta afinidade e produzem grandes quantidades de anticorpos (ABBAS et al., 2012).

Dentre as diferentes classes de anticorpos, destacam-se para a triagem pré-natal a Imunoglobulina M (IgM) e a Imunoglobulina G (IgG). Em termos gerais, a IgM está relacionada a uma resposta imune primária, ocorrida na fase aguda das doenças, enquanto a IgG participa da resposta imune secundária, ou seja, na fase crônica da doença, já que linfócitos B de memória frequentemente expressam essa imunoglobulina de membrana. Além disso, a IgG pode atravessar a barreira placentária, ou seja, ser transmitida da mãe para o feto, conferindo imunidade passiva, o que protege o neonato contra infecções (ABBAS et al., 2012).

1.3 Infecções congênicas

1.3.1 Citomegalovirose

Taxonomicamente, o citomegalovírus (CMV) pertence à família Herpesviridae, subfamília Betaherpesvirinae, gênero Cytomegalovirus, espécie herpesvirus humano 5 (ICTV, 2014).

A infecção tem altíssima prevalência mundial, especialmente nos países subdesenvolvidos, nos quais 90% da população está infectada, frente aos 60% estimados nos países desenvolvidos. A transmissão ocorre por urina, saliva, secreções vaginais, leite materno, sêmen e transfusões sanguíneas. O CMV apresenta a característica de latência, sendo possível sua reativação em casos de supressão imunológica, como durante a gestação, na qual a transmissão vertical pode ocorrer por via transplacentária. As vias de entrada do CMV são o epitélio genitourinário, o trato digestivo superior e o trato respiratório, enquanto no feto o vírus ingressa pela circulação sanguínea. A transmissão materno-fetal também se dá de forma perinatal, ou seja, a infecção ocorre pelo contato com as secreções genitais da mãe durante o parto ou através da lactação (SANBONMATSU; RUIZ; NAVARRO-MARÍ et al., 2014).

Cerca de 90% dos neonatos infectados são assintomáticos durante o nascimento e 10% desenvolvem distúrbios neurossensoriais no decorrer da vida, dentre os quais destaca-se a perda auditiva, sequela mais frequente na infecção congênita (AZEVEDO et al., 2005. SWANSON; SCHLEISS, 2013).

A infecção por CMV induz a formação de anticorpos IgM, IgA e IgG. Os anticorpos IgM podem persistir durante 2-8 meses e são decorrentes tanto de uma infecção primária quanto de reativação. A diferenciação se dá pelo teste de avidéz

de anticorpos IgG: baixa avidéz indica infecção primária recente, enquanto a alta a exclui (GARCÍA-BERMEJO; ORY-MANCHÓN, 2015). Anticorpos IgA podem ser detectáveis por até 1 ano depois. Em pacientes imunodeprimidos, a produção de IgM pode não ocorrer em valores detectáveis. Os anticorpos IgG surgem logo após a infecção primária, durante a qual ocorre aumento do título, que declina posteriormente e prevalece por toda a vida. Em gestantes, a presença de IgG prévia à gestação se correlaciona com menor risco de transmissão para o feto (MÉNDEZ; SIA, 1999).

No Brasil, estudos demonstram prevalência de anticorpos IgG para CMV em gestantes na ordem de 65.5% a 92% e alta incidência da infecção congênita devido à transmissão materno-fetal que pode ocorrer após a infecção primária ou reativação (SANTOS et al., 2000; MEDEIROS et al., 2007).

1.3.2 Toxoplasmose

Toxoplasma gondii é um protozoário do filo apicomplexa de distribuição geográfica mundial, com alta prevalência sorológica, podendo atingir mais de 60% da população em determinados países (NEVES et al., 2004).

Possui ciclo biológico heteroxeno, já que apresenta o hospedeiro definitivo – no qual ocorre a fase sexuada - e o hospedeiro intermediário, que possui apenas o ciclo assexuado.

Fase Assexuada: nos linfonodos e nos tecidos de vários hospedeiros mamíferos (inclusive gatos e outros felídeos) e aves.

Fase Sexuada ou Coccidiana: nas células do epitélio intestinal de gatos jovens (e outros felídeos) não-imunes.

As formas infectantes de *T. gondii* são denominadas taquizoítos, bradizoítos e oocistos. Os **taquizoítos** são encontrados durante a fase aguda da doença, também chamada de fase proliferativa. É uma forma móvel, de rápida multiplicação (*tachos* = rápido) pelo processo de endodiogenia, o qual ocorre no interior do vacúolo parasitóforo de várias células e resulta em duas células-filhas formadas dentro da célula-mãe.

Os **bradizoítos** são encontrados em vários tecidos durante a fase crônica da infecção. Proliferam-se lentamente (*brady* = lento) também por endodiogenia dentro do vacúolo parasitóforo de diferentes células, como dos sistemas muscular e nervoso, cujas membranas formam os cistos teciduais que podem abrigar inúmeros bradizoítos em seu interior.

Oocistos são a forma resistente às condições ambientais devido a sua parede dupla. São produzidos nas células intestinais de felídeos não-imunes e eliminados juntos com as fezes.

A infecção humana por *T. gondii* ocorre por três vias principais:

- 1) Ingestão de oocistos presentes em alimentos ou água contaminados;
- 2) Ingestão de cistos encontrados em carne crua ou malcozida;

3) Congênita ou transplacentária: transferência de taquizoítos da gestante (hospedeiro intermediário) para o feto, decorrente de infecção primária da mãe durante a gestação ou por reativação de infecção prévia em mães imunodeprimidas (Figura 3).

Do ponto de vista da toxoplasmose congênita, cerca de 70% das crianças acometidas são assintomáticas ao nascimento e aproximadamente 10% têm manifestação grave nos primeiros dias de vida. Podem apresentar doença multissistêmica ou isoladamente em sistema nervoso e/ou forma ocular (REMINGTON et al., 2011).

Figura 3: Ciclo representativo da Toxoplasmose Congênita. Fonte: *Google Images*.

No Brasil, a prevalência da toxoplasmose em gestantes é superior a 60% (Figura 4) e a triagem sorológica pré-natal é sugerida como política pública não obrigatória, sendo oferecida gratuitamente em algumas regiões, como no Mato Grosso do Sul (CARELLOS; ANDRADE; AGUIAR, 2008).

Figura 4: Prevalência mundial de toxoplasmose em gestantes.

Fonte: Pappas G. *Int J Parasitol*, 2009.

A resposta imune contra *T. gondii* envolve mecanismos humoral e celular. Do ponto de vista humoral, a produção de imunoglobulinas IgM aparece inicialmente, na chamada fase aguda da doença, seguida pela produção de IgG que pode ser detectada pelas reações sorológicas dentro de oito a 12 dias após a infecção pelo *T. gondii*. Por sua vez, na imunidade celular, a proliferação intracelular de taquizoítos acarreta a produção de interleucinas que estimulam a atuação das células T CD8+ efetoras em sinergismo com as células T CD4+ (NEVES et al., 2005).

Em gestantes, a investigação de IgG anti-toxoplasma durante a primeira consulta pré-natal permite identificar aquelas soronegativas e que, portanto, apresentam risco de contrair a infecção. Nesse caso, medidas preventivas são recomendadas assim como o controle sorológico trimestral para verificar uma possível soroconversão. Quando o estudo sorológico demonstra presença simultânea de IgM e IgG, é necessária a realização do teste de avidéz de IgG, o qual, se inferior a 30%, indica infecção materna recente, ou seja, ocorrida nos últimos quatro meses (NEWTON, 1999). Nesse caso, recomenda-se o diagnóstico

da infecção fetal mediante PCR no líquido amniótico (GARCÍA-BERMEJO; ORY-MACHÓN, 2015; WALLON et al., 2010).

A determinação de IgG específica nos neonatos detecta os anticorpos maternos transmitidos por via transplacentária. No entanto, o monitoramento mensal de IgG nos primeiros 6-12 meses de vida pode ajudar a discernir se os anticorpos se devem à transferência materna ou são uma resposta imune do bebê infectado. Isso é possível porque a vida média dos anticorpos maternos é de 25-30 dias, portanto a evolução de IgG pode ser uma ferramenta útil para realizar o diagnóstico da infecção congênita (GARCÍA-BERMEJO; ORY-MACHÓN, 2015).

1.3.3 Rubéola

A Rubéola é uma doença de etiologia viral (vírus RNA, pertencente ao gênero *Rubivirus*, família *Togaviridae*) que propicia imunidade prolongada e acomete principalmente crianças entre cinco e nove anos. A transmissão ocorre pelo contato com secreções da via respiratória. Após um período de incubação, que varia de duas a três semanas, a doença mostra seus primeiros sinais característicos: febre baixa, surgimento de gânglios linfáticos e de manchas rosadas, que se espalham primeiro pelo rosto e depois pelo resto do corpo. A rubéola é comumente confundida com outras doenças, pois sintomas como dores de garganta e de cabeça são comuns a outras infecções, dificultando seu diagnóstico. Apesar de não parecer grave, em gestantes o contágio está diretamente relacionado à Síndrome da Rubéola Congênita (SRC), causada pela transmissão transplacentária do vírus, que pode levar ao aborto e más-formações no feto e recém-nascido como: glaucoma,

catarata, problemas cardíacos, retardo no crescimento, surdez, entre outras (FIOCRUZ, 2014).

No mundo, estima-se que anualmente ocorram cerca de 110 mil nascimentos de crianças com SRC (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). No Brasil, rubéola foi incluída na lista de doenças de notificação compulsória somente na segunda metade da década de 1990. Em 1997, foram notificados cerca de 30.000 casos de rubéola, sendo que, no período de 1999 a 2001, ocorreram surtos em vários estados do país. Nesse período, observou-se um aumento progressivo no número de casos suspeitos de SRC (de 200 para 600), o que refletiu tanto o aumento da circulação do vírus, com incidências de 5/100.000 mulheres na faixa etária de 15 a 19 anos e de 6,3/100.000 mulheres na faixa etária de 20-29 anos de Rubéola, como o incremento de estratégias de vigilância para a detecção de casos (BRASIL, 2014).

Assim como em outros países, no Brasil a vacina contra Rubéola está disponível no programa de imunização desde 1992 quando tríplice-viral (Rubéola, Caxumba e Sarampo) começou a ser implementada no Estado de São Paulo, atingindo, no ano 2000, as unidades de saúde pública dos demais Estados (Figura 5). Em 2007, o Ministério da Saúde confirmou surtos em 20 estados e 577 cidades, representando um incremento de 80% no número de casos notificados. Frente a essa situação, em 2008 ocorreu a maior Campanha de Vacinação da Rubéola no mundo, com imunização de 65,9 milhões de pessoas em todo o Brasil, o que representou uma cobertura vacinal de 94% (BRASIL, 2014).

Em virtude do extenso programa de imunização e demais ações de vigilância epidemiológica, no início de dezembro de 2015 o Brasil recebeu da Organização Mundial de Saúde (OMS) o Certificado de Eliminação da Rubéola, já que desde 2008 o país não registra casos da doença, inclusive de sua forma congênita, o que

indica a interrupção da transmissão autóctone, isto é, dentro do território nacional (BRASIL, 2015).

A imunização acarreta a produção de anticorpos IgG de memória imunológica passíveis de atravessar a barreira placentária. Apesar disso, frente a uma sorologia positiva para anticorpos IgG anti-Rubéola, não se pode descartar a possibilidade de infecção pelo vírus durante a gestação, uma vez que os níveis de IgG aumentam a partir de aproximadamente 35 dias após a infecção inicial e a transferência passiva destas imunoglobulinas é significativa somente após 16 ou 20 semanas de gestação. Por outro lado, a resposta fetal humoral só se torna efetiva também por volta da segunda metade da gestação. Desta maneira, existe um hiato entre a época da infecção do conceito e a resposta imune efetiva, possibilitando a ocorrência da Síndrome da Rubéola Congênita (BRASIL, 2004).

Figura 5: Países que apresentam vacina contra Rubéola em seu programa nacional de imunização. Fonte: *World Health Organization*, 2012.

O teste sorológico para investigação de anticorpos IgG circulantes é uma das medidas preventivas recomendadas por obstetras em áreas com baixa cobertura vacinal, pois se a gestante é suscetível, é aconselhada a evitar o contato com

pacientes de Rubéola e receber imunização após o parto (DOBSON et al., 2015). Além disso, é recomendado a todas as mulheres que desejam engravidar a realização da sorologia para Rubéola para que possam ser vacinadas antes da gravidez, caso ainda estejam suscetíveis à infecção, já que a vacina é constituída de vírus vivos atenuados que podem atravessar a placenta e infectar o feto e, portanto, é contraindicada durante a gestação. As crianças devem ser vacinadas antes de entrarem na idade fértil (MIRANDA et al., 2012).

1.4 Métodos para triagem de doenças infecciosas durante a gestação

A triagem sorológica das doenças infecciosas agrupadas sob o a sigla TORCHS é recomendada pelo Ministério da Saúde e instituições como Federação Brasileira de Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) e Associação Médica Brasileira (AMB) (MIRANDA et al., 2012). Um abrangente estudo nacional, envolvendo 35.512 gestantes que fizeram triagem sorológica para várias infecções congênicas utilizando papel filtro, encontrou baixa prevalência, mas destaca a importância do rastreamento universal das infecções devido aos graves comprometimentos fetais e neonatais que podem provocar (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2007).

Para realização do teste sorológico em programas de triagem, dentre as diversas técnicas laboratoriais disponíveis, destaca-se o método amplamente utilizado denominado *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Baseado no conceito elementar da imunologia da ligação antígeno-anticorpo, o ensaio utiliza anticorpos específicos e enzimas mediadoras de alteração de cor para detectar a

presença de antígenos ou anticorpos em uma determinada amostra biológica, mesmo em baixíssimas concentrações (GAN; PATEL, 2013).

Na pesquisa de anticorpos circulantes, o método utiliza antígenos do patógeno responsável pela doença investigada imobilizados em uma fase sólida, os quais têm a função de capturar anticorpos específicos, quando presentes na amostra de soro analisada. A esses anticorpos ligam-se anticorpos secundários acoplados a uma enzima que converte um substrato cromogênico em um produto com coloração diferenciada, indicando a presença da imunoglobulina investigada na amostra (Figura 6). Tanto análises quantitativas quanto qualitativas podem ser realizadas a partir da leitura colorimétrica deste ensaio (GAN; PATEL, 2013).

Figura 6 – Etapas do ensaio ELISA (modificado). Fonte: *Journal of Investigative Dermatology* (2013)

O método de ELISA apresenta diferentes formatos, conforme apresentado na figura 7. Em linhas gerais, são definidos como:

a) Ensaio direto: utilizado para detecção de antígenos na amostra. Anticorpos de captura estão aderidos à placa, aos quais os antígenos presentes se ligam. A esses antígenos, ligam-se os anticorpos de detecção, associados à enzima responsável pela reação colorimétrica.

b) Ensaio indireto: analisa indiretamente a quantidade de antígenos específicos em uma amostra, correlacionando-a à concentração de anticorpos primários que, ao se ligarem a um anti-anticorpo associado à enzima, resultam na intensidade da cor formada durante a reação.

c) Amplificação de sinal por complexo avidina-biotina: utiliza um complexo de alta afinidade para amplificar o sinal colorimétrico e facilitar a leitura do ensaio. A biotina, que foi identificada primeiramente como fator de crescimento de leveduras, em 1935, trata-se de um nutriente essencial para humanos (vitamina do complexo B) e que está presente em muitos alimentos, além de ser sintetizada pelas bactérias intestinais. A deficiência de biotina está relacionada ao consumo excessivo de ovos crus, porque a clara do ovo contém uma glicoproteína, chamada avidina, que se liga fortemente à biotina (constante de dissociação, $K = 10^{-15}$ M) e impede sua absorção intestinal (VOET; VOET, 2013). Biotina contém domínio ativo que se liga a aminoácidos, portanto se ligar a Anticorpos. Avidina pode ser saturada com fluorocromo sem perder a afinidade pela biotina. Após reação antígeno-anticorpo não marcado, biotina marcada com anticorpo secundário é adicionada e em seguida adiciona-se a avidina marcada com um fluorocromo. Como muitas moléculas de biotina se ligam ao anticorpo, há uma amplificação do sinal.

d) Ensaio sanduíche: utilizado para identificar antígenos específicos em uma amostra. A superfície dos orifícios da microplaca é recoberta com anticorpos primários que capturam o antígeno presente na amostra. Anticorpos secundários acoplados à enzima ligam-se ao antígeno, desencadeando a reação de cor que se relaciona indiretamente à concentração de antígenos presente na amostra.

d) Ensaio competitivo: baseia-se no processo de reação competitiva entre os antígenos da amostra avaliada e os antígenos que estão aderidos à superfície dos orifícios da microplaca com o anticorpo primário. Primeiramente, o anticorpo primário é incubado com a amostra, resultando em um complexo antígeno-anticorpo que é adicionado aos orifícios recobertos com o mesmo antígeno. Após um período de incubação, anticorpos que não se ligaram são removidos por lavagem. Quanto mais antígenos na amostra, menos anticorpos primários estarão disponíveis para se ligar aos antígenos que recobrem a superfície dos orifícios. Logo, quando o anticorpo secundário conjugado à enzima é adicionado, seguida pela adição do substrato para ocorrência do sinal cromogênico ou fluorescente, a ausência de sinal significa presença de antígeno na amostra avaliada. A vantagem desse método consiste na alta sensibilidade, capaz de detectar antígenos mesmo em baixas concentrações (GAN; PATEL, 2013)

e) Ensaio multiplex (multiparamétrico): são aqueles que avaliam vários parâmetros simultaneamente, isto é, em um único ensaio é possível detectar a presença de diferentes antígenos ou anticorpos em uma mesma amostra biológica, utilizando como princípio algum dos métodos anteriormente citados. Trata-se de uma moderna tecnologia que tem como principais vantagens a economia de tempo e reagentes.

Figura 7 – Diferentes formatos de ELISA

Nesse contexto dos ensaios imunofluorimétricos no formato *multiplex*, a Luminex Corporation, companhia norte-americana parceira da *Intercientífica* - empresa da qual a autora da presente dissertação fez parte durante este projeto - desenvolveu a metodologia xMAP® baseada em uma combinação de sistemas fluídicos, ópticos e digitais, similar à citometria de fluxo, capaz de separar e classificar partículas microscópicas suspensas em um meio líquido em fluxo. Entretanto, enquanto a maioria de citômetros de fluxo utiliza microesferas de diferentes tamanhos e intensidade de cores, a tecnologia xMAP® usa microesferas de poliestireno de um único tamanho (5,6 micrômetros) e um processo patenteado de coloração que permite até 500 diferentes combinações de corantes internos, ou

seja, até 500 microesferas identificadas individualmente pela sua coloração interna (LUMINEX CORPORATION, 2014).

A superfície das microesferas é carboxilada, o que permite o acoplamento de reagentes específicos (tais como antígenos ou anticorpos) através de ligações covalentes e a consequente captura e detecção do analito escolhido. A existência de 500 identificações de microesferas permite a criação de ensaios biológicos multiparamétricos, isto é, pode-se analisar variados parâmetros a partir do acoplamento de diferentes reagentes à superfície de microesferas distintas utilizadas simultaneamente em um único ensaio. Juntamente com a amostra biológica a ser analisada, são adicionadas as microesferas referentes aos parâmetros de interesse, além de um sistema de detecção composto por um anticorpo acoplado a um fluorocromo: o analito se liga à microesfera e o detector ao analito.

A análise do ensaio é efetuada pelo equipamento MagPix®, o qual funciona baseado em dois *lasers* que incidem sobre as microesferas: um *laser* verde, que emite um sinal luminoso com comprimento de onda de 532nm, excita o detector e evidencia sua reação de ligação ao analito; um *laser* vermelho, de comprimento de onda da ordem de 635nm, o qual excita os corantes internos da microesfera, identificando-a (Figura 8). Os sinais luminosos emitidos são convertidos para digitais, processados por um software e expressos em MFI (*Multiple Fluorescence Intensity*).

Figura 8: Tecnologia xMAP®. Fonte: *Luminex Corporation*, 2014

Quando comparado com o método de ELISA, a vantagem da metodologia xMAP® consiste no fato de que com apenas uma amostra biológica é possível detectar diferentes analitos em um mesmo ensaio, conferindo economia de tempo, amostras e reagentes.

Sendo assim, a tecnologia xMAP® é uma possível alternativa para melhoria da eficiência dos programas de triagem pré-natal no país, uma vez que permite a análise rápida e simultânea de diferentes patologias - dentre as quais pode-se incluir as doenças infecciosas supracitadas - utilizando-se apenas uma amostra de 3mm de diâmetro de sangue coletado em papel de filtro, conhecida popularmente por “picote”.

2 OBJETIVO

O presente projeto visa o desenvolvimento de um produto multiparamétrico utilizando a tecnologia xMAP® para detecção simultânea de anticorpos da classe IgG anti-Toxoplasmose, anti-Rubéola e anti-Citomegalovírus em amostras de sangue coletado em papel de filtro.

O produto, inédito no mercado nacional, tem o objetivo de atender à demanda específica da Triagem Pré-natal no país que conta com cerca de 4 grandes clientes, os quais realizam mensalmente cerca de 15 - 20.000 testes.

Como objetivos específicos podem-se citar: a melhoria da eficiência dos programas de triagem pré-natal, graças à economia de tempo, amostras e reagentes; a contribuição financeira para o Brasil, uma vez que será produzido nacionalmente, gerando emprego e renda; a possibilidade de ampliar o mercado a partir do desenvolvimento futuro de novos produtos baseados na mesma metodologia.

3 METODOLOGIA

Em linhas gerais, o desenvolvimento do “Produto multiparamétrico para triagem pré-natal de anticorpos IgG contra doenças infecciosas” contou com 7 etapas, as quais estão listadas na Figura 9.

Figura 9: Etapas do desenvolvimento

3.1 Escolha dos antígenos de captura e detector

Em estudos anteriores, diferentes antígenos foram acoplados à superfície das microesferas pela equipe de Pesquisa & Desenvolvimento da *Intercientífica*, a qual elegeu aqueles que apresentaram, isoladamente, melhor captura dos anticorpos IgG presentes em amostras controle de sangue coletado em papel de filtro. Uma das propostas desse projeto foi verificar o funcionamento do sistema de captura utilizando 3 microesferas simultaneamente.

Antígenos isolados de *Toxoplasma* e Rubéola foram acoplados nas microesferas de números 56 e 29, respectivamente. Dois antígenos de CMV foram acoplados simultaneamente na microesfera de identificação 18, pois se constatou que a mistura de antígenos acarretou melhor detecção das amostras IgG positivas.

A detecção ficou a cargo de um anticorpo secundário anti-IgG ligado ao composto fluorescente estreptavidina-ficoeritrina conjugado à biotina.

A *Intercientífica* não autorizou a divulgação das concentrações exatas de antígenos de captura e detector utilizadas.

3.1.1 – Antígeno de captura: *Toxoplasma gondii* antigen grade III

Fornecedor: *Meridian Life Science*. Número de catálogo: EV8131.

Antígeno natural de membrana de taquizoítos, denominado p30 ou SAG1. Propagado em células imortais do tipo “HeLa”, apresenta imunorreatividade com IgG e IgM.

3.1.2 Antígeno de captura: Rubella virus grade IV

Fornecedor: *Meridian Life Science*. Número de catálogo: 6076.

Antígeno natural purificado a partir de cultura de células renais do macaco verde africano - as chamadas células “VeRo” - infectadas com o vírus HPV77. Apresenta 90% de pureza.

3.1.3 – Antígenos de captura: Cytomegalo Virus Pp52 (UL44) Recombinant & Cytomegalo Virus Pp150 (UL32) Recombinant

Fornecedor: *ProSpec*. Número de catálogo: CMV-214 e CMV-216, respectivamente.

Proteínas recombinantes derivadas de *E.coli* e purificadas por cromatografia (>95% de pureza). Região imunodominante composta pelos aminoácidos 202-434 e 1011-1048, respectivamente.

3.1.4 – Detector: PE-IgG conjugate, goat anti-human IgG F(ab), Fc specific

Fornecedor: Moss Conjugates (Moss Inc., Pasadena, MA, EUA)

Anticorpo policlonal de cabra com especificidade pela porção Fc (região constante) da imunoglobulina G (IgG).

Derivada da bactéria *Streptomyces avidinii*, a estreptavidina trata-se de uma proteína com alta afinidade pela coenzima biotina. Com uma constante de dissociação da ordem de 10^{-14} mol/L ($K_d = 10^{-14}$ mol/L), a ligação não-covalente entre biotina e estreptavidina é uma das mais fortes conhecidas na natureza (DE CHANCIE; HOUK, 2007).

A ficoeritrina trata-se de uma ficobiliproteína que atua na fotossíntese de algas vermelhas do gênero *Rhodophyta*. Sua absorvância se dá em um comprimento de onda da ordem de 540 nm, região verde do espectro visível. Sua emissão de fluorescência é máxima a 580 nm (WIT et al., 2006).

3.2 – Acoplamento

Graças à superfície carboxilada das microesferas, é possível o acoplamento de diferentes moléculas, tais como os antígenos listados nos itens 3.1.1 a 3.1.3.

Esta etapa teve como referência o protocolo original de acoplamento de proteínas às microesferas magnéticas (SAMPLE PROTOCOL FOR TWO-STEP CARBODIIMIDE COUPLING OF PROTEIN TO MagPlex™-C MAGNETIC CARBOXYLATED MICROSPHERES) fornecido pela Luminex Corporation, o qual encontra-se no Anexo I (LUMINEX CORPORATION, 2007).

Para definir qual quantidade ideal de antígeno acoplada à microesfera, foram realizados acoplamentos com 6µg, 12,5µg, 25µg e 50µg de cada antígeno, conforme recomendações constantes no item 17 do Anexo I.

Cada microesfera acoplada aos antígenos foi testada isoladamente em um ensaio padrão (vide item 3.2.1) utilizando-se amostras controle de sangue coletado em papel de filtro produzidas com material biológico fornecido pela empresa norte-americana SeraCare. Através do ensaio foi possível avaliar: 1) o funcionamento do acoplamento, ou seja, se as amostras positivas são corretamente capturadas pelas microesferas e posteriormente detectadas; 2) qual a massa mais adequada, isto é, a menor quantidade de antígenos utilizada capaz de conferir boa distinção entre as MFI's dos controles positivos e negativos. Para este parâmetro adotou-se que a MFI do controle positivo deveria ser no mínimo três vezes maior que a do controle negativo.

3.2.1 - Protocolo de ensaio padrão

O protocolo de ensaio padrão foi estabelecido com base em outros produtos já existentes no mercado e comercializados pela *Intercientífica* que utilizam a tecnologia xMAP®. Em linhas gerais, as etapas para sua condução estão listadas na Figura 10.

Figura 10: Etapas do ensaio padrão utilizando a tecnologia xMAP®

3.3 Otimização

Após a definição da melhor massa de acoplamento, as microesferas dos três parâmetros (Toxo, Rub e CMV) foram misturadas e aplicadas em um mesmo ensaio utilizando o protocolo padrão (item 3.2.1). Diversos teste foram realizados com o objetivo de diminuir o volume de reagentes utilizados e com isso reduzir os custos de produção e aumentar a lucratividade, sem, contudo, perder a reprodutibilidade.

3.4 Avaliação da reprodutibilidade

Ensaio foram conduzidos com amostras controle para avaliar a reprodutibilidade intra- e interensaios. A avaliação intraensaio verificou a similaridade dos resultados em MFI entre amostras iguais em posições diferentes na mesma microplaca. Já a avaliação interensaio apurou a reprodução de resultados em MFI similares para amostras iguais em diferentes microplacas, isto é, em ensaios subsequentes.

3.5 Determinação do *cut-off*

Basicamente, o *cut-off*, ou valor de corte, é o limite numérico que separa as amostras consideradas positivas das negativas.

Para determinar o *cut-off* do produto, foram analisados os resultados de MFI de 770 amostras sabidamente negativas, a partir dos quais calculou-se a média ($\sum v_N$) somada ao desvio padrão (DP), conforme a fórmula:

$$\text{Cut-off} = \sum v_N + (2 \times DP)$$

Através do cálculo, os seguintes valores de corte em MFI foram determinados:

Parâmetro	TOXO	RUB	CMV
<i>Cut-off</i> (MFI)	600	300	500

Importante ressaltar que o protótipo desenvolvido envolve uma metodologia qualitativa. Dessa forma, os valores de MFI acima mencionados são apenas um limite utilizado pelo software do equipamento para classificar as amostras como positivas ou negativas, não havendo qualquer vínculo com o valor numérico e a concentração de anticorpos IgG circulantes nos pacientes.

3.6 Testes com amostras reais

Nesta etapa, amostras controle positivas e negativas foram avaliadas e classificadas a partir do *cut-off* estabelecido na etapa anterior, descrita no item 3.5, para confirmar se o limite numérico estabelecido foi suficientemente correto.

3.7 Comparativo

Foram analisadas 1499 amostras de gestantes, coletadas em papel de filtro, cedidas e previamente triadas pela Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Goiânia (APAE-Goiânia) com o objetivo de comparar os resultados obtidos através da análise com o protótipo desenvolvido com aqueles já confirmados pelo laboratório utilizando a tradicional metodologia de ELISA, realizado conforme descrito na Figura 6 (item 1.4). As amostras cedidas não continham qualquer dado referente à identidade da gestante, apenas uma identificação numérica que associava a amostra ao seu resultado positivo, negativo ou intermediário.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados expressos a seguir tratam-se de um compilado dos principais dados obtidos durante o desenvolvimento do projeto, visto que a *Intercientífica* se reservou o direito de não divulgar todas as informações de forma a proteger sua propriedade intelectual.

Para verificar o funcionamento do ensaio multiparamétrico, isto é, quando na presença simultânea das três diferentes identificações de microesferas acopladas aos antígenos listados nos itens 3.1.1 a 3.1.3, adotou-se como correto aquele capaz de distinguir uma amostra controle positiva com um valor de MFI no mínimo três vezes maior que o encontrado para uma amostra controle negativa, além de identificar corretamente a imunorreatividade para os diferentes parâmetros avaliados simultaneamente.

Nos resultados expressos na Tabela 1 nota-se clara distinção entre as amostras positivas e negativas de um mesmo parâmetro, bem como a identificação correta de amostras positivas para mais de um parâmetro simultaneamente, caso das quais estão denominadas como Toxo-Rub, Toxo-CMV, Rub-CMV e Controle *Multiplex*, o qual é positivo para as três doenças. Tais controles foram preparados com mistura de hemácias e plasmas reativos de cidadãos norte-americanos doados para a empresa SeraCare (Milford, MA, EUA) a qual testa e comercializa o material biológico para confecção de amostras controle.

Ressalta-se que o controles de Toxoplasmose e Citomegalovírus apresentaram-se positivos também para o parâmetro Rubéola (resultados em **negrito**). Isso é explicado pelo fato de que as amostras foram produzidas com material biológico doado de norte-americanos e, uma vez que a vacinação contra

Rubeóla está presente no programa nacional de imunização dos Estados Unidos, segundo informações disponíveis na página virtual do órgão governamental *Center for Disease Control and Prevention* (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015), dificilmente são encontrados doadores não imunorreativos para este parâmetro, visto que a vacina acarreta a produção de anticorpos IgG de memória imunológica.

Tabela 1: Resultados em MFI de uma análise utilizando amostras controle em duplicata e diferentes microesferas acopladas aos antígenos de CMV, Rubéola e Toxo.

Amostra	CMV 214/216	RUB Grade IV	TOXO III
Branco	162	177.5	160
Controle Negativo	280.5	283	172
Controle Negativo	263	284	180
Controle <i>Multiplex</i>	1617.5	1493.5	1439
Controle <i>Multiplex</i>	1421.5	1454	1323
Toxo Positiva	506	1540.5	2749
Toxo Positiva	496.5	1549	2765
Rub Positiva	235	2614	176
Rub Positiva	235.5	2565	176
CMV Positiva	7427	2340	184
CMV Positiva	7391	2405.5	180
Toxo-Rub Positiva	320	1922	1290
Toxo-Rub Positiva	323	1985	1316
Toxo-CMV Positiva	3351	1107	1328
Toxo-CMV Positiva	3258.5	1104	1303
Rub-CMV Positiva	3159	1998	176
Rub-CMV Positiva	3269	1992	178.5

Após verificado correto funcionamento do ensaio multiparamétrico, foram realizados testes de otimização, especialmente do volume de detector, já que este reagente representa boa parte do custo final do produto. Os resultados da Tabela 2 demonstram que a redução de 50% no volume aplicado por orifício não acarretou perda significativa do sinal de MFI e/ou prejuízo à distinção correta de amostras positivas de negativas. A redução a volumes inferiores a 50µL sequer foi testada

pois a experiência prévia com clientes do mercado de triagem pré- e neonatal demonstra que baixos volumes ocasionam dificuldades e falhas no processo de pipetagem predominantemente manual nos programas de triagem do Brasil.

Tabela 2: Resultados (em MFI) quando adicionados 100 μ L e 50 μ L do detector

Amostra	CMV 214/216		RUB Grade IV		TOXO III	
	100 μ L	50 μ L	100 μ L	50 μ L	100 μ L	50 μ L
Branco	191	199	189,5	201	202,5	209
Controle Negativo	268	266	230	233	211	214
Controle Negativo	269	260	236	220	213	204
Controle Multiplex	2137,5	2043,5	723	702,5	1339,5	1348
Controle Multiplex	1557	1609	683	670	1131	1113
Controle Positivo Toxo					2721	2538
Controle Positivo Toxo					2808	2383
Controle Positivo Rub			1249,5	1270		
Controle Positivo Rub			1246	1209		
Controle Positivo CMV	9054	7882				
Controle Positivo CMV	8566	8083,5				

Uma vez otimizado, o produto multiparamétrico foi verificado quanto a sua reprodutibilidade intra- e interensaio. Os resultados demonstram similaridade dos resultados em MFI entre as amostras repetidas em uma mesma microplaca e também entre amostras analisadas em microplacas em dois dias subsequentes (Figura 11).

Figura 11: Avaliação intra- e interensaio

Por fim, a partir da análise de 1499 amostras de sangue de gestantes coletadas em papel de filtro, gentilmente cedidas e previamente testadas pela APAE-Goiânia, foi possível estabelecer um comparativo bem como calcular os valores de Concordância, Sensibilidade e Especificidade (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparativo entre os resultados obtidos com o produto multiparamétrico desenvolvido e os resultados fornecidos pela APAE-Goiânia

Parâmetro analisado	Amostras analisadas	Cut-off (MFI)	INT*	VN*	FN*	VP*	FP*	Concordantes	Concordância	Sensibilidade	Especificidade
TOXO	1499	600	76	709	102	790	149	1172	78.19%	88.57%	82.63%
RUB	1499	300	32	113	80	1386	57	1330	88.73%	94.54%	66.47%
CMV	1499	500	1	22	76	1477	15	1407	93.86%	95.11%	59.46%

* INT = Intermediário / VN = Verdadeiro-negativos / FN = Falso-negativos / VP = Verdadeiro-positivos / FP = Falso-positivos

Sensibilidade = $VP / (VP + FN)$ Especificidade = $VN / (VN + FP)$

Sensibilidade é a capacidade que um teste tem de discriminar, dentre os suspeitos de uma patologia, aqueles efetivamente doentes, ou seja, sensibilidade é “a positividade na doença”. A especificidade, por sua vez, é a capacidade que o mesmo teste tem de ser negativo, em face de uma amostra de indivíduos que sabidamente não têm a doença em questão, isto é, a “negatividade na saúde” (GUIMARÃES, 1985).

Os resultados da tabela 3 indicam uma baixa especificidade principalmente para os parâmetros Rubéola e Citomegalovírus. Diante da utilização de 1.000 amostras espera-se uma eficiência no reconhecimento de infecção dentro do intervalo de confiança de 95% (THE TDR DIAGNOSTICS EVALUATION EXPERT PANEL et al., 2010). Diante de 207 amostras utilizadas para controles negativos (sendo N=170 e N=37 para Rubéola e Citomegalovírus, respectivamente), uma alta especificidade não é esperada.

No entanto, as taxas de especificidade foram estimadas entre 66 e 82%, o que poderia ser proveniente da detecção de ligações não específicas ou ainda de uma heterogeneidade intrínseca presente nas amostras avaliadas.

O sucesso no desenvolvimento de um kit para diagnóstico depende da disponibilidade de amostras de pacientes realmente infectados e não infectados. Também foram vistas alterações na especificidade dos kits utilizados na detecção de patógenos em fases diferentes de doença e foi muito menor se IgM for utilizado, sendo entre 30 e 100% (BIZZINI et al., 2015). A validação de um teste também se torna mais difícil na falta de ensaios de padronização (com valores de especificidades já conhecidos). Além disso, é importante levar em consideração características da população para qual o diagnóstico será utilizado, como, por exemplo, a suposta medida de infecção poderia resultar de uma reação cruzada do anticorpo já conhecida ou ainda de mutações no antígeno proveniente do patógeno a ser avaliado. Nesse sentido, outros antígenos deveriam ser testados e avaliados em testes de verificação a fim de se estimar a presença ou não de infecção por outros métodos analíticos (THE TDR DIAGNOSTICS EVALUATION EXPERT PANEL et al., 2010).

5 CONCLUSÕES

A partir do exposto, observa-se que foram atingidos valores de concordância com os resultados das amostras de pacientes fornecidas pela APAE-Goiânia, bem como de Sensibilidade, superiores a 78% para todos os parâmetros. Por outro lado, os valores de Especificidade foram mais baixos, principalmente para os parâmetros Rubéola e Citomegalovírus. Importante ressaltar o pequeno número de amostras com resultado negativo para Citomegalovírus e Rubéola fornecido pela APAE-Goiânia (respectivamente: N = 37, o que equivale a 2,47% do total amostral e N = 170, equivalente a 11,34% do total amostral), o que reflete diretamente no cálculo da Especificidade do produto.

Teoricamente, o melhor teste para triagem é aquele com maior sensibilidade e especificidade. No entanto, quando a triagem é realizada em população de alto risco, testes com maior sensibilidade têm preferência sobre aqueles com alta especificidade, porque são melhores em detectar a doença, isto é, apresentam menor número de resultados falso-negativos.

Sendo assim, uma vez que a população de gestantes triada é considerada de alto risco para os três parâmetros analisados, pode-se inferir que é aceitável um teste mais sensível que específico. Porém, análises adicionais com amostras sabidamente negativas para a presença de anticorpos IgG anti-Rubéola e anti-Citomegalovírus fazem-se necessárias para obtenção de percentuais de especificidade mais confiáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.H.; PILLAI, S. **Celular and Molecular Immunology**. 7 ed. Philadelphia:Elsevier Mosby Saunders, 2012. 560 p.
- APAE CAMPO GRANDE – ASSOCIAÇÃO DOS PAIS E AMIGOS DOS EXCEPCIONAIS.Disponível em: <http://www.campogrande.apaebrasil.org.br>> Acesso em: Maio 2015.
- AZEVEDO, P.F. et al. Congenital cytomegalovirus infection: a case report. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 750-758, 2005.
- BIZZINI, A. et al. Evaluation of a new serological test for the detection of anti-Coxiella and anti-Rickettsia antibodies. **Microbes and Infection**, San Francisco, v. 17, p. 811-816, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso**, Brasília, v. II, 3 ed., p. 137, 2004.
- BRASIL. Portal Brasil. **Brasil está livre da rubéola**. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/brasil-esta-livre-da-rubeola>>. Acesso em: dez. 2015.
- BRASIL. Portal da Saúde. **Situação Epidemiológica – Dados**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/761-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/rubeola/11443-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: dez. 2015.
- CARELLOS, E.V.M; ANDRADE, G.M.Q.; AGUIAR, R.A.L.P. Avaliação da aplicação do protocolo de triagem pré-natal para toxoplasmose em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: estudo transversal em puérperas de duas maternidades. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 391-401, 2008.
- CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Measles Vaccination**. Atlanta, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/measles/vaccination.html>>. Acesso em: jun. 2015.
- DE CHENCIE, J.; HOUK, KN. The Origins of Femtomolar Protein–Ligand Binding: Hydrogen Bond Cooperativity and Desolvation Energetics in the Biotin–(Strept)Avidin Binding Site. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.129, p.5419-5429, 2007.
- DOBSON, S.R. et al. **Congenital rubella syndrome: management, outcome and prevention**. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/congenital-rubella-syndrome-management-outcome-and-prevention?source=see_link> Acesso em: dez. 2015.
- FIGUEIRÓ-FILHO, E.A. et al. Frequência das infecções pelo HIV-1, rubéola, sífilis, toxoplasmose, citomegalovírus, herpes simples, hepatite B, hepatite C, doença de Chagas e HTLV I/II em gestantes do Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.40, p.181-187, 2007.
- FIOCRUZ – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Rubéola: sintomas, transmissão e prevenção**. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/rubeola-sintomas-transmissao-e-prevencao>> Acesso em: nov. 2015.
- GAN, SD; PATEL, KR. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Investigative Dermatology**, London, v. 133 (?), p.1-3, 2013.
- GARCÍA-BERMEJO, I; ORY-MANCHÓN, F. Serological diagnosis of congenital infections and algorithms to improve diagnostic efficacy. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 33, p. 20-26, 2015.
- GÓMEZ, J.F.B. et al. Comparação da coleta de amostras de sangue na triagem pré-natal, utilizando o papel de filtro e punção venosa na técnica de ELISA para detecção de Sífilis. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Niterói, v. 22, p.123-128, 2010.

GUIMARÃES, M.C.S. Exames de Laboratório: Sensibilidade, Especificidade, Valor preditivo positivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 18, p. 117-120, 1985.

ICTV – INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY VIRUSES. **Virus Taxonomy: 2014 Release**. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: Jun. 2015.

LUMINEX CORPORATION. **Sample protocol for two-step carbodiimide coupling of protein to MagPlex™- C Magnetic Carboxylate Microspheres**, Austin, 2007. 3 p.

LUMINEX CORPORATION. **xMap Technology**. Austin, 2014. Disponível em: <www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/>. Acesso em: abril 2014.

MADI, J.M. et al. Prevalence of toxoplasmosis, HIV, syphilis and rubella. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 14, p. 24-29, 2010.

MEDEIROS, R.L.F. et al. Detecção do citomegalovírus humano em doadores de sangue através e PCR em tempo real. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 393 – 400, 2007.

MEI, J.V. et al. Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.131, p. 1631S–1636S, 2001.

MÉNDEZ, J.C.; SIA, I.G. Human cytomegalovirus. **Laboratory Diagnosis of Viral Infections**, 3 ed. New York-Basel: Marcel Dekker Inc., 1999. p. 361-372.

MIRANDA, M.M.S. et al. *Rastreamento das infecções perinatais na gravidez: realizar ou não?* FEMINA, v. 40, nº1, p.13-22, 2012.

NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 498 p.

NEWTON, E.R. Diagnosis of Perinatal TORCH Infections. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, United States, v. 42, p. 59-70, 1999.

REMLINGTON, J.S. et al. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 7 ed. Philadelphia:Elsevier Mosby Saunders, 2011. 1280 p.

SANBONMATSU-GÁMEZ, S.; RUIZ, M.P.; NAVARRO-MARÍ, J.M. Infection by human cytomegalovirus. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 32, p. 15-22, 2014.

SANTOS, D.V.V. et al. Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 42, p. 129 – 132, 2000.

STEGMANN, B.J.; CAREY, J.C. TORCH Infections: Toxoplasmosis, Other (syphilis, varicella zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus (CMV), and Herpes infections. **Current women's health reports**, Philadelphia, v. 2, p. 253-258, 2002.

SWANSON, E.C., SCHLEISS, M.R. Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 60, p. 335-349, 2013.

TDR DIAGNOSTICS EVALUATION EXPERT PANEL et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 8, p. 17-29, 2010.

VOET, Donald; VOET, Judith G. *Bioquímica*. 4.ed. São Paulo: Artmed, 2013.

WALLON, M. et al. Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v.115, p. 727-733, 2010.

WIT, C.D.W. et al. How Energy Funnels from the Phycoerythrin Antenna Complex to Photosystem I and Photosystem II in Cryptophyte Rhodomonas CS24 Cells. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 110, p.25066-25073, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rubella – Fact Sheets**. Geneva, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs367/en/>>. Acesso em: maio 2015

ANEXO

SAMPLE PROTOCOL FOR TWO-STEP CARBODIIMIDE COUPLING OF PROTEIN TO MagPlex™-C MAGNETIC CARBOXYLATED MICROSPHERES

Microspheres should be protected from prolonged exposure to light throughout this procedure.

1. Resuspend the stock uncoupled microsphere suspension according to the instructions described in the Product Information Sheet provided with your microspheres.
2. Transfer 5.0×10^6 of the stock microspheres to a **USA Scientific** microcentrifuge tube.
3. Place the tube into a magnetic separator and allow separation to occur for 30 to 60 seconds. See **Technical Note 1**.
4. With the tube still positioned in the magnetic separator, remove the supernatant. Take care not to disturb the microspheres.
5. Remove the tube from the magnetic separator and resuspend the microspheres in 100 μ L dH₂O by vortex and sonication for approximately 20 seconds.
6. Place the tube into a magnetic separator and allow separation to occur for 30 to 60 seconds.
7. With the tube still positioned in the magnetic separator, remove the supernatant. Take care not to disturb the microspheres.
8. Remove the tube from the magnetic separator and resuspend the washed microspheres in 80 μ L 100 mM Monobasic Sodium Phosphate, pH 6.2 by vortex and sonication for approximately 20 seconds.
9. Add 10 μ L of 50 mg/mL Sulfo-NHS (diluted in dH₂O) to the microspheres and mix gently by vortex.
10. Add 10 μ L of 50 mg/mL EDC (diluted in dH₂O) to the microspheres and mix gently by vortex.
11. Incubate for 20 minutes at room temperature with gentle mixing by vortex at 10 minute intervals.
12. Place the tube into a magnetic separator and allow separation to occur for 30 to 60 seconds.
13. With the tube still positioned in the magnetic separator, remove the supernatant. Take care not to disturb the microspheres.
14. Remove the tube from the magnetic separator and resuspend the microspheres in 250 μ L of 50 mM MES, pH 5.0 by vortex and sonication for approximately 20 seconds. See **Technical Note 2**.
15. Repeat steps 12. and 13. This is a total of two washes with 50 mM MES, pH 5.0.
16. Remove the tube from the magnetic separator and resuspend the activated and washed microspheres in 100 μ L of 50 mM MES, pH 5.0 by vortex and sonication for approximately 20 seconds.
17. Add 125, 25, 5 or 1 μ g protein to the resuspended microspheres. (Note: We recommend titration in the 1 to 125 μ g range to determine the optimal amount of protein per specific coupling reaction.)
18. Bring total volume to 500 μ L with 50 mM MES, pH 5.0.
19. Mix coupling reaction by vortex.
20. Incubate for 2 hours with mixing (by rotation) at room temperature.
21. Place the tube into a magnetic separator and allow separation to occur for 30 to 60 seconds.

22. With the tube still positioned in the magnetic separator, remove the supernatant. Take care not to disturb the microspheres.
23. Remove the tube from the magnetic separator and resuspend the coupled microspheres in 500 μ L of PBS-TBN by vortex and sonication for approximately 20 seconds. See **Technical Note 3**.
24. Incubate for 30 minutes with mixing (by rotation) at room temperature. (Note: Optional – perform this step when using the microspheres the same day.)
25. Place the tube into a magnetic separator and allow separation to occur for 30 to 60 seconds.
26. With the tube still positioned in the magnetic separator, remove the supernatant. Take care not to disturb the microspheres.
27. Remove the tube from the magnetic separator and resuspend the microspheres in 1 mL of PBS-TBN by vortex and sonication for approximately 20 seconds. See **Technical Note 4**.
28. Repeat steps 25. and 26. This is a total of two washes with 1 mL PBS-TBN.
29. Remove the tube from the magnetic separator and resuspend the coupled and washed microspheres in 250-1000 μ L of PBS-TBN.
30. Count the microsphere suspension by hemacytometer.
Calculation: Total microspheres = count (1 corner of 4 x 4 section) x (1 x 10⁴) x (dilution factor) x (resuspension volume in mL)
31. Store coupled microspheres refrigerated at 2-8°C in the dark.

Technical Note 1: For a list of magnetic separators, see **Recommended Materials for Magnetic Microspheres**. Optimal separation time may vary with the type of separator used.

Technical Note 2: Coupling can be performed in 100 mM MES, pH 6.0 with similar results. For some proteins, better solubility and better coupling may be achieved at a higher coupling pH or in a different buffer. If your protein does not couple satisfactorily under these recommendations, try PBS, pH 7.4 as an alternate coupling buffer.

Technical Note 3: Either PBS-TBN (PBS, 0.1% BSA, 0.02% Tween-20, 0.05% Azide, pH 7.4) or PBS-BN (PBS, 1% BSA, 0.05% Azide, pH 7.4) may be used as Blocking/Storage Buffer.

Technical Note 4: Either PBS-TBN or PBS, 0.05% Tween-20 may be used as Wash Buffer.