ELIANE PESSOA DA SILVA

Desenvolvimento de teste rápido, usando "*dipsticks*", para diagnóstico de *Streptococcus pnemoniae*

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2014

ELIANE PESSOA DA SILVA

Desenvolvimento de teste rápido, usando "*dipsticks*", para diagnóstico de *Streptococcus pnemoniae*

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Waldely de Oliveira Dias

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Eliane Pessoa da.
Desenvolvimento de teste rápido, usando "dipsticks", para diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae* / Eliane Pessoa da Silva. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Waldely de Oliveira Dias.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de teste diagnóstico.

Versão do título para o inglês: Development of rapid test using "dipsticks" for diagnosis of *Streptococcus pneumoniae*.

1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Dipstick 3. Particular coloidais 4. Diagnóstico. I. Dias, Prof. Dr. Waldely de Oliveira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB020/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Eliane Pessoa da Silva.

Título da Dissertação: Desenvolvimento de teste rápido, usando "dipsticks", para diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae.*

Orientador(a): Prof. Dr. Waldely de Oliveira Dias.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

INSTITUTO BUTANTAN

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Testes imunocromatográficos rápidos para o diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae*" **protocolo nº 810/11**, sob a responsabilidade de Waldely de Oliveira Dias e Eliane Pessoa da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 18/04/2011.

We certify that the research entitled "Rapid immunochromatografic tests for diagnosis of *Streptococcus pneumoniae*", **protocol n° 810/11**, under the responsibility of Waldely de Oliveira Dias and Eliane Pessoa da Silva, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 04/18/2011.

Vigência do Projeto: 04/2011 – 05/2013	**N° de animais/espécie**
Centro de Biotecnologia	100 camundongos Balb/c Fêmeas 100 camundongos Swiss Fêmeas 50 camundongos CFW Fêmeas

São Paulo, 19 de abril de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

Aos meus queridos pais, Manoel e Ana e ao meu amado esposo Anderson, pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida, por minha fé e perseverança.

Gostaria de agradecer em especial a duas pessoas que me mostraram o quanto é bela e apaixonante a pesquisa científica, primeiramente a minha orientadora, Dra Waldely, em seguida a Dra Elisabete Sbrogio: o incentivo, suas perspectivas, apoio e ensinamentos foram de um valor inestimável para conclusão do curso de mestrado e para minha vida.

Às minhas queridas amigas de laboratório: Luciana, Pamela, Ana Fabíola, Priscila, Luciene e Miriam. A amizade, cumplicidade e companheirismo de vocês foram essenciais para que essa etapa fosse concluída.

À Dra Farida Nato pelo fornecimento dos anticorpos monoclonais.

À doutoranda Cibelly Goulart pelo fornecimento dos isolados clínicos e da proteína recombinante pneumolisina, essenciais para a conclusão deste estudo.

Aos pesquisadores doutores: Isaias Raw, Martha, Luciana Leite, Mickie, Giovana, Ivan e Dunia pelo apoio técnico e científico.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia: André, Marisa, Sueli, Fátima e Toninho.

Aos funcionários da Fermentação: Lorivaldo, Hélio e Máximo. Um agradecimento especial à Ana, por todo amor e capricho que conduz seus trabalhos técnicos de apoio à pesquisa dos pesquisadores e alunos.

Aos funcionários do Biotério do Centro de Biotecnologia: Carol e Giovanni pelo auxilio técnico, disposição e cuidado com os camundongos.

Aos funcionários da GUIMA pelo apoio técnico.

Ao CNPq e Fundação Butantan, pelo financiamento desta pesquisa.

Obrigada!

RESUMO

SILVA, E. P**. Desenvolvimento de teste rápido, usando "*dipsticks*", para diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae*.** 2014. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Doenças invasivas causadas por *S. pneumoniae* provocam cerca de 1,5 milhões de mortes anuais de crianças no mundo. Testes imunocromatográficos rápidos (*dipsticks*) são alternativos a métodos diagnósticos tradicionais, devido à fácil execução e baixo custo. Neste estudo foram desenvolvidos *dipsticks* para diagnóstico de *S. pneumoniae* utilizando: **anticorpos de captura - monoclonais anti-pneumolisina recombinante (Ply)** - AcMs D9-43 e E10-24, reativos contra 21 sorotipos prevalentes de *S. pneumoniae*; **anticorpos de detecção (conjugados com diferentes partículas coloidais coloridas - corante têxtil, microesferas e nanopartículas de ouro) -** Igs anti-Ply e anti-vacina pneumocócica celular (em desenvolvimento no Instituto Butantan) (anti-WCPV). *Dipsticks* com anti-Ply ou anti-WCPV conjugados com ouro ou microesferas coloidais detectaram a bactéria em todos os sorotipos prevalentes avaliados, entre 10^4 e 10^5 UFC/ml e pneumolisina nativa, em sobrenadantes de cultivo de *S. pneumoniae,* até uma concentração estimada ≤ 19,3 ng/ml e 9.7 ng/ml, respectivamente. Os resultados foram visualizados em aproximadamente 10 min.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae. Dipstick.* Partículas coloidais. Diagnóstico.

ABSTRACT

SILVA, E. P. **Development of rapid test using "dipsticks" for diagnosis of *Streptococcus pneumoniae*.** 2014. 109 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Invasive diseases caused by *S. pneumoniae* are responsible for about 1.5 million child deaths per year worldwide. Rapid Immunochromatographic tests (dipsticks) are alternative to traditional diagnostic methods due to easy execution and low cost. In this study, dipsticks have been developed for diagnosis of *S. pneumoniae* using: **capture antibodies** - monoclonal anti- recombinant pneumolysin (Ply), MAbs D9-43 and E10-24, reactive against 21 prevalent serotypes of *S. pneumoniae*; **detection antibodies (conjugated with different colored colloidal particles - textile dye; microspheres and gold nanoparticles)** - anti-Ply and anti–whole cell pneumococcal vaccine (in developing in the Butantan Institute) (anti- WCPV). Dipsticks with anti-Ply or anti-WCPV conjugated with colloidal gold or microspheres detected the bacterium in all the evaluated prevalent serotypes, between 10^4 e 10^5 CFU/ml, and native pneumolysin in culture supernatants of *S. pneumoniae* to an estimated concentration ≤ 19.3 ng/ml and 9.7 ng/ml, respectively. The results could be visualized in around 10 min.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae. Dipstick.* Colloidal particles. Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fatores de Virulência do *S. pneumoniae*..... 22

FIGURA 2 - Lista dos segmentos de mercado em que os imunoensaios *Dipsticks* já estão em produção ou em desenvolvimento..... 35

FIGURA 3: Componentes do *Dipstick*..... 40

FIGURA 4: Princípio do teste *Dipstick*..... 40

FIGURA 5: Determinação do pico de absorção da luz visível (Aλmax) dos corantes têxteis.. 64

FIGURA 6: *Dispsticks* confeccionados com corante têxtil Azul Brilhante R..... 67

FIGURA 7: Avaliação de diferentes tampões de conjugação anticorpo/microesfera Estapor.70

FIGURA 8: Temperatura de incubação da MN após aplicação dos anticorpos de captura.....72

FIGURA 9: Detecção de *S. pneumoniae* ou de pneumolisina por anti-WCPV conjugado a microesferas Estapor..... 74

FIGURA 10: Detecção qualitativa de diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* por *dipstick: (A)* (Conjugado anti-WCPV/ Microesfera Estapor Blue A4. (B) Conjugado anti-Ply/ Microesfera Estapor Blue A4..... 75

FIGURA 11: Detecção qualitativa de diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* por *dipstick:* conjugado anti-WCPV/ Microesfera Estapor Blue A4..... 75

FIGURA 12: Limite de detecção de *S. pneumoniae* por *dipstick* com conjugado anti-WCPV/microesfera Estapor Black WO..... 76

FIGURA 13: Limite de detecção de pneumolisina nativa por *dipstick* com conjugado anti-WCPV/microesfera Estapor Black WO..... 77

FIGURA 14: SDS-PAGE em gel de acrilamida 12% e Western Blotting de Ply e sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae* contra soro anti-Ply..... 78

FIGURA 15: Limite de detecção de pneumolisina por *dipstick* com conjugado anti-Ply/microesfera Estapor Black WO..... 79

FIGURA 16: Determinação da concentração ótima de anticorpos para estabilização do ouro coloidal..... 81

FIGURA 17: Bloqueio da Porção da amostra (*sample pad)*..... 82

FIGURA 18: Reprodutibilidade do Bloqueio da Porção da amostra (*sample pad)*..... 83

FIGURA 19: Escolha da MN para confecção dos d*ipsticks*..... 84

FIGURA 20: Detecção qualitativa de sorotipos de *S. pneumoniae* por *dipstick:* conjugado anti-WCPV/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)..... 85

FIGURA 21: Detecção qualitativa de sorotipos de *S. pneumoniae* por *dipstick:* conjugado anti-Ply/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)..... 86

FIGURA 22: Detecção qualitativa de sorotipos de *S. pneumoniae* por *dipstick:* conjugado anti-Ply/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)..... 87

FIGURA 23: Limite de detecção de *S. pneumoniae* por *dipstick* com conjugado anti-WCPV/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)..... 88

FIGURA 24: Limite de detecção de pneumolisina por *dipstick* com conjugado anti-WCPV/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich).....

FIGURA 25: Limite de detecção de *S. pneumoniae* por *dipstick* com conjugado anti-Ply/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)..... 90

FIGURA 26: Limite de detecção de pneumolisina por *dipstick* com conjugado anti-Ply/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)..... 91

FIGURA 27: Detecção de *S. pneumoniae* ou de pneumolisina recombinante (Ply) por anti-WCPV conjugado com ouro coloidal 0,01% (Sigma-Aldrich)..... 92

FIGURA 28: Teste de estabilidade de conjugado utilizando Microesfera Estapor como reagente de detecção..... 93

FIGURA 29: Teste de estabilidade do ouro coloidal como reagente de detecção..... 94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Vacinas pneumocócicas..... 27

TABELA 2: Anticorpos monoclonais..... 43

TABELA 3: Isolados clínicos de *S.pneumoniae*..... 45

TABELA 4: Relação entre taxa de fluxo da membrana e sua sensibilidade..... 53

TABELA 5: Definição das condições de secagem da MN após deposição do AcM de captura..... 54

TABELA 6: % de reatividade dos diferentes anticorpos monoclonais contra isolados humanos de *S.pneumoniae*..... 61

TABELA 7*:* Avaliação de AcM anti-Ply D9-43 contra isolados humanos de *S.pneumoniae*.... 62

TABELA 8: Peso seco dos resíduos após lavagem e secagem dos corantes..... 63

TABELA 9: Determinação da diluição do corante em água para obter Abs = 1..... 64

TABELA 10: Condições de conjugação anticorpo/corante têxtil..... 66

TABELA 11: Definição das condições de secagem da MN após deposição do AcM de captura..... 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(-) – Controle negativo

Abs – Absorbância

AcM – Anticorpo Monoclonal

AcP – Imunoglobulinas obtidas de Soro Policlonal

Ig Anti-Ply – Imunoglobulinas obtidas de Soro Policlonal anti-pneumolisina recombinante

Ig Anti-WCPV – Imunoglobulinas obtidas de Soro Policlonal anti-vacina pneumocócica celular

AΛmax – Pico de absorbância máxima

BSA – Albumina Sérica Bovina

C – Linha controle do *dipstick*

CPS – Cápsula Polissacarídica

DO – Densidade Óptica

ELISA – Enzime Linked Immunosorbent Assay

FDA – Food and Drugs Administration

HCG – Gonadotrofina Coriônica Humana

Ig - Imunoglobulina

IgG – Imunoglobulina G

Lyt A - Autolisina

M - Molar

MES – Ácido Monomorfolinoetanosulfônico

mM – Milimolar

MN – Membrana de Nitrocelulose

mg – miligrama

ml - mililitro

nM – Nanômetro

ng - nanograma

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPD – Orto-Fenildiamina

PEG - Polietilenoglicol

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salina)

PCR – *Polymerase chain reaction*

pI – Ponto Isoelétrico

Ply – Pneumolisina recombinante

PMN – Células Polimorfonucleares

PsaA - Antígeno A de superfície de pneumococo

PspA - Proteína A de superfície de pneumococo

PspA 2 - Proteína A de superfície de pneumococo de clado 2

PspA 3 - Proteína A de superfície de pneumococo de clado 3

PspC - Proteína C de superfície de pneumococo

RMP – Rotações por minuto

SDS – PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (sulfatododecil de sódio – eletroforese de gel poliacrilamida)

T – Linha teste do *dipstick*

TFC – Tempo de Fluxo Capilar

THY - Meio Todd Hewitt acrescido de 0,05 % de extrato de levedura

UFC – Unidade Formadora de Colônia

V – Volume

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 18

1.1 O *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*..... 18

1.2 RELAÇÃO PARASITA- HOSPEDEIRO..... 19

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA..... 21

1.3.1 CÁPSULA POLISSACARÍDICA..... 21

1.3.2 ANTÍGENOS PROTEICOS DE PNEUMOCOCOS..... 22

1.3.2.1 PNEUMOLISINA..... 23

1.3.2.2 PROTEÍNA A DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO (PspA)..... 24

1.3.2.3 PROTEÍNA C DE SUPERFÍCIE (PspC)..... 25

1.3.2.4 ANTÍGENO A DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO (PsaA)..... 25

1.3.2.5 AUTOLISINA (LytA) 26

1.3.2.6 NEUROAMINIDASES..... 26

1.4 VACINAS PNEUMOCÓCICAS..... 27

1.5 DIAGNÓSTICO DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*..... 30

1.5.1 MICROSCOPIA E CULTURA..... 31

1.5.2 REAÇÃO DE QUELLUNG..... 31

1.5.3 SUSCETIBILIDADE À OPTOQUINA E SOLUBILIDADE EM BILE..... 32

1.5.4 HEMOCULTURAS..... 32

1.5.5 EXAME DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO..... 32

1.5.6 EXAME DE ESCARRO..... 32

1.5.7 EXAME DE ASPIRADO PULMONAR..... 33

1.5.8 AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX..... 33

1.5.9 DETECÇÃO MOLECULAR..... 33

1.5.10 TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS RÁPIDOS..... 34

2 JUSTIFICATIVA DO PROJETO..... 37

3 OBJETIVOS..... 38

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 38

4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 39

4.1 PRINCIPIO E DESENVOLVIMENTO DO TESTE DE *DIPSTICK*..... 39

4.2 ANTICORPOS DE DETECÇÃO..... 41
4.2.1 ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO..... 42
4.2.2 PRECIPITAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS..... 43
4.3 ANTICORPOS DE CAPTURA..... 43
4.3.1 CULTIVO E ESTOCAGEM DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*..... 43
4.3.2 INATIVAÇÃO DAS CEPAS DE *S.PNEUMONIAE*..... 44
4.3.3 AVALIAÇÃO DA BATERIA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA OS DIFERENTES ISOLADOS DE *S.PNEUMONIAE*..... 44
4.4 CONJUGAÇÃO COM CORANTE COLOIDAL TÊXTIL DYSTAR©..... 46
4.4.1 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO DOS RESÍDUOS DOS CORANTES APÓS LAVAGEM. 47
4.4.2 OBTENÇÃO DAS CURVAS DE ABSORBÂNCIA POR CONCENTRAÇÃO DE CADA CORANTE..... 47
4.4.3 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CADA CORANTE..... 48
4.4.4 PREPARAÇÃO DO CONJUGADO (CORANTE/ANTICORPO DE DETECÇÃO)..... 48
4.4.5 AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS NÃO CONJUGADOS AO CORANTE..... 50
4.5 CONJUGAÇÃO COM MICROESFERAS COLOIDAIS COLORIDAS ESTAPOR®..... 50
4.6 CONJUGAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO COLOIDAL..... 51
4.6.1 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE OURO COLOIDAL..... 51
4.6.2 PREPARAÇÃO DO CONJUGADO (ANTICORPO DE DETECÇÃO/OURO COLOIDAL)..... 51
4.7 LIOLIFIZAÇÃO DOS CONJUGADOS..... 52
4.8 BLOQUEIO DA PORÇÃO DA AMOSTRA (*SAMPLE PAD*)..... 52
4.9 ESCOLHA E PADRONIZAÇÃO DA MEMBRANA DE NITROCELULOSE (MN)..... 53
4.10 MONTAGEM DOS *DIPSTICKS* E CORRIDA DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO..... 54
4.11 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA..... 55
4.11.1 AVALIAÇÃO DE PNEUMOLISINA NATIVA EM SOBRENADANTES DE CULTIVO *DE S. PNEUMONIAE*..... 55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 56
5.1 AVALIAÇÃO DA BATERIA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA OS DIFERENTES ISOLADOS DE *S.PNEUMONIAE* 60

5.2 *DIPSTICK* UTILIZANDO ANTICORPO DE DETECÇÃO CONJUGADO COM CO COLOIDAL TÊXTIL DYSTAR© 62

5.3 *DIPSTICK* UTILIZANDO ANTICORPO DE DETECÇÃO CONJUGADO A MICROESFERAS COLOIDAIS COLORIDAS ESTAPOR®..... 69

5.3.1 MONOCLONAIS E POLICLONAIS COMO ANTICORPOS DE CAPTURA OU COMO CONJUGADOS NOS *DIPSTICKS*..... 70

5.3.2 DEFINIÇÃO DA TEMPERATURA DE SECAGEM E ARMAZENAMENTO DA MN..... 71

5.3.3 *DIPSTICK* CONFECCIONADO COM ANTI-WCPV CONJUGADO A MICROESFERAS ESTAPOR: DETECÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE *S. PNEUMONIAE* E PNEUMOLISINA..... 73

5.3.4 *DIPSTICK* CONFECCIONADO COM ANTI-PLY CONJUGADO A MICROESFERAS ESTAPOR: LIMITE DE DETECÇÃO DE PNEUMOLISINA..... 79

5.4 *DIPSTICK* UTILIZANDO ANTICORPO DE DETECÇÃO CONJUGADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO COLOIDAL..... 80

5.4.1 BLOQUEIO DA PORÇÃO DA AMOSTRA (*SAMPLE PAD*)..... 81

5.4.2 ESCOLHA DA MEMBRANA DE NITROCELULOSE (MN)..... 83

5.4.3 *DIPSTICK* CONFECCIONADO COM ANTI-WCPV OU ANTI-PLY, CONJUGADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO: DETECÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE *S. PNEUMONIAE* E PNEUMOLISINA..... 85

5.5 ESTABILIDADE DO REAGENTE DE DETECÇÃO..... 92

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 95

7 CONCLUSÕES..... 98

REFERÊNCIAS..... 99

1 INTRODUÇÃO

1.1 O *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

O *Streptococcus pnemoniae*, também conhecido como pneumococo, é uma bactéria anaeróbica facultativa, Gram positiva, em formato de diplococo ou cadeias curtas lanceoladas, quando visualizada em microscopia. O pneumococo não possui esporos, vacúolos ou flagelos. Sua morfologia, quando analisada em colônias crescidas em agar sangue é geralmente lisa e brilhante, podendo apresentar variação fenotípica quanto à opacidade, em alguns sorotipos (JENNINGS et al., 1980). Essa variação está associada a múltiplos determinantes de superfície, que podem contribuir com a capacidade do microrganismo de interagir com o hospedeiro (KIM; WEISER, 1998).

A superfície do pneumococo consiste de três estruturas distintas: membrana plasmática, parede celular e cápsula polissacarídica.

A membrana plasmática é formada por uma bicamada lipídica típica contendo proteínas e moléculas de ácido teicóico associadas a resíduos de fosfocolina (MURRAY et al., 2009). A parede celular possui uma espessa camada de peptideoglicano formada por cadeias de polissacarídeos que alternam N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico, interligadas por cadeias de oligopeptídeos que determinam ligações cruzadas por intermédio de pontes de pentaglicina e diversas proteínas e moléculas de ácido teicóico ancoradas em sua superfície (MURRAY et al., 2009; RAW; MARTINS, 2006). O ácido teicóico exposto estende-se através da camada de peptideoglicano sobrejacente, sendo um determinante específico do pneumococo, denominado polissacarídeo C, que precipita uma globulina sérica (Proteína C), na presença de cálcio (MURRAY et al., 2009); também possui resíduos de colina e é responsável pela intensa resposta inflamatória observada na infecção por pneumococo (DAWSON et al., 2004).

Os pneumococos ainda possuem uma cápsula formada por polímeros de 2-8 subunidades de oligossacarídeos, os quais determinam diferentes sorotipos (RAW; MARTINS, 2006).

O *Streptococcus pneumoniae* é um dos principais patógenos associados a doenças pneumocócicas invasivas, incluindo, sepse, meningite e mais frequentemente, a pneumonia,

além de doença primária de mucosa, como otite média (MOFFITT; MALLEY, 2011; WERNO; MURDOCH, 2008), estando entre as maiores causas de morbidade e mortalidade. Estima-se que o *S. pneumoniae* seja responsável por cerca de 1,5 milhão de mortes de crianças com menos de cinco anos de idade por ano no mundo (MUSHER, 1992; PEREZ-DORADO; GALAN-BARTUAL; HERMOSO, 2012; SCHUCHAT et al., 2001), com uma taxa de mortalidade de 5-22% na fase inicial da doença, sendo que grupos associados à etnia e distribuição geográfica estão incluídos como fatores de risco para o desenvolvimento de doenças pneumocócicas (WHO, 2007).

A meningite é a apresentação mais severa da doença pneumocócica (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004a). Mesmo em infecções por cepas totalmente suscetíveis à antibioticoterapia, ainda existe uma taxa de mortalidade de 10% em casos de pneumonia e 20-50% de meningite (BARICHELLO, 2012). Essa situação é pior quando a quimioterapia falha, devido a cepas resistentes. Com a ampla disponibilidade e uso excessivo de antibióticos, cepas multirresistentes a antibióticos de amplo espectro tornam-se cada vez mais predominantes. A antibioticoterapia em cepas resistentes acarreta elevação dos custos no tratamento de pacientes, devido ao aumento do tempo de permanência nas unidades hospitalares (QUACH et al., 2002).

O aumento de cepas resistentes deve-se em parte, à dificuldade de se distinguir a infecção respiratória bacteriana da viral, um problema particularmente importante em crianças. Um estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde revelou que apenas 20% das infecções respiratórias necessitam de antibióticos, pelo que 80% dos doentes são tratados desnecessariamente, o que pode levar à emergência de cepas resistentes (WHO, 2000). O combate à resistência deve centrar-se particularmente na prevenção da doença através de campanhas de vacinação (MACHADO-SEQUEIRA, 2004) e na identificação rápida e adequada do microrganismo para a escolha do melhor tratamento (GOLDSTEIN; ACAR, 1996; LEE et al, 1991).

1.2 RELAÇÃO PARASITA- HOSPEDEIRO

Um importante determinante do sucesso ecológico do *S.pneumoniae* está na habilidade de se transferir de um hospedeiro para o outro em diferentes ambientes (DAGAN

et al., 1996). Dessa forma, muitos indivíduos podem ser colonizados por múltiplos sorotipos, que variam de acordo com a região geográfica, densidade populacional, condições socioeconômicas e faixa etária (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004a).

A idade é um importante fator de risco para a taxa de colonização, sendo maior em crianças até dois anos de idade, decrescendo significativamente com o aumento da faixa etária e voltando a crescer novamente em idades mais avançadas (DAGAN et al., 1998; KADIOGLU et al., 2008). Em países em desenvolvimento, as taxas de colonização são muito elevadas. Em amostras seriadas tomadas a intervalos de 1-2 semanas, Gratten et al. (1994) mostraram que 60% das crianças em Papua, Nova Guiné, haviam adquirido *S. pneumoniae* (e *Haemophilus influenzae*) já durante o período neonatal e foram colonizadas por ambos os organismos nos primeiros três meses de vida. O prazo de colonização por pneumococo variou de 5 a 290 dias (média de 96 dias). Um terço das mães que não eram portadoras de pneumococos ou *H. influenzae*, tornaram-se subsequentemente colonizadas por essas bactérias adquiridas por seus bebês (GRATTEN et al., 1994).

Segundo Bogaert (2004a), toda doença pneumocócica começa com a colonização, isto é, a criação do estado de portador, e está associada às principais causas de infecções do trato respiratório e doenças invasivas. O estabelecimento da doença ocorre geralmente após a geração local de fatores inflamatórios, tais como interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF), desencadeados principalmente por infecções virais (KADIOGLU et al., 2008). As manifestações mais comuns associadas às doenças pneumocócicas incluem otite média aguda, pneumonia, meningite e bacteremia, que está associada à maior morbidade e mortalidade (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004a; DAGAN et al., 1996).

A colonização experimental de adultos tem sido utilizada para investigar os fatores que afetam a suscetibilidade do indivíduo para aquisição de *S.pneumoniae,* revelando que a colonização induz à produção de imunoglobulina, tanto de mucosa quanto sistêmica (KADIOGLU et al., 2008; LIPSITCH et al, 2005). A resposta imune fraca de mucosa pode conduzir à colonização persistente e recorrente, e consequentemente, à infecção, enquanto que a resposta imune sistêmica pode eliminar o patógeno e prevenir a recolonização (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004a; SIMELL et al., 2001). Tem sido observado em alguns estudos que anticorpos IgG e IgA dirigidos contra polissacarídeos capsulares e

proteínas associadas à superfície têm sido observados na saliva de crianças em resposta à colonização com *S pneumoniae* (SIMELL et al., 2001).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

1.3.1 CÁPSULA POLISSACARÍDICA

A cápsula polissacarídica (CPS) está presente em diversos patógenos extracelulares causadores de doenças invasivas, como meningites e bacteremias. É um dos principais fatores de virulência de diversos agentes etiológicos, como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *Neisseria meningitidis* (SCOTT et al., 1996).

Os pneumococos são agrupados em 93 sorotipos identificados até o momento, com base na estrutura química e sorológica de diferentes polissacarídeos capsulares (RODGERS; KLUGMAN, 2011; SCOTT, et al., 1996). Sua patogenicidade está relacionada a mecanismos de inibição da opsonofagocitose, inibindo a ligação do componente C3b do complemento à superfície bacteriana, o que impede o reconhecimento de seus receptores por células fagocíticas (NELSON et al., 2007). A CPS também é crucial para a colonização do trato respiratório na fase inicial, pois impede a remoção mecânica do patógeno a partir do muco, podendo também restringir a autólise e reduzir o acesso de antibióticos (VARVIO et al., 2009). Entretanto, estudos *in vitro* sugerem que a cápsula também pode ser um obstáculo para a adesão das bactérias na superfície celular do hospedeiro, sendo as variantes “transparentes”, com quantidade reduzida de CPS, capazes de aderir melhor ao revestimento epitelial do trato respiratório do que as variantes “opacas” (BROWN, 1983; JONSSON et al., 1985; MITCHELL; MITCHELL, 2010; NELSON, 2007; VARVIO et al., 2009).

Apesar dos 93 sorotipos de polissacarídeos capsulares, a grande maioria das doenças pneumocócicas está associada a um número restrito de sorotipos. Os mais comuns associados a doenças pneumocócicas são: 3, 19, 14, 4, 6A, 6B, 7, 9N, 9V, 11, 12, 15A, 15F, 16, 18C, 19F, 22, 23a e 23b (BLASI et al., 2012), sendo os sorotipos 3, 6A, 6B, 9N e 19F associados a um maior risco de morte durante a pneumonia bacteriana (DOCKRELL; WHYTE; MITCHELL, 2012).

Em recente estudo epidemiológico conduzido por Andrade et al. (2012) no período de 2007 a 2009 em uma cidade do Brasil com crianças menores de cinco anos de idade, foi demonstrado que o sorotipo 14 respondeu por 45% dos isolados de *S.pneumoniae,* seguido por 6B, 18C, 23F, 3, 9V, 19A, e 19F. Em estudos anteriores, entre 1997 e 2001, os mesmos autores encontraram isolados invasivos prevalentes pertencentes aos sorotipos 14, 1, 5 e 6B (LAVAL et al., 2006), e um estudo de vigilância laboratorial em três cidades no Brasil, em 1993, identificou os sorotipos 1, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 19F, 19A e 23F como predominantes em isolados clínicos de doenças pneumocócicas invasivas (BRANDILEONE et al., 1997).

1.3.2 ANTÍGENOS PROTEICOS DE PNEUMOCOCOS

Nas últimas décadas foram descritos vários fatores proteicos de virulência de pneumococos (FIGURA 1), dentre eles Pneumolisina, Proteína A de superfície de pneumococo, Proteína C de Superfície, autolisina e neuroaminidases. Se essas proteínas são importantes na patogênese, é justo presumir que a resposta imune conferida contra tais antígenos esteja envolvida na proteção ou atenuação dos sintomas contra a doença e sua utilização como candidatas a antígenos vacinais ou diagnósticos clínicos seria bastante conveniente, desde que sejam comuns aos diferentes sorotipos e apresentem baixa diversidade antigênica.

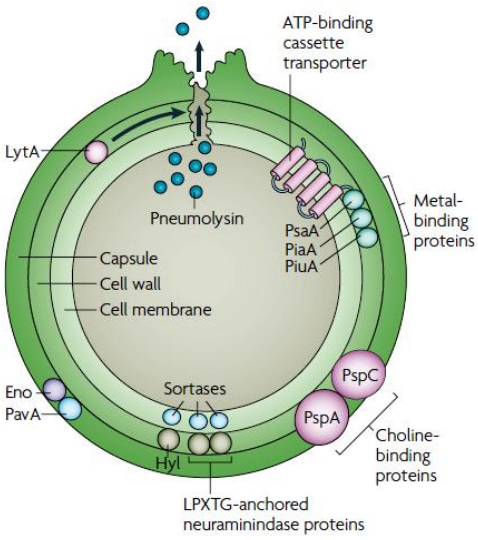

FIGURA 1: **Fatores de Virulência do *S. pneumoniae***. Adaptado de KADIOGLU, 2008.

1.3.2.1 PNEUMOLISINA

A pneumolisina é uma proteína citoplasmática de 53 KDa com 471 resíduos de aminoácidos, membro da família citolisina colesterol-dependente e está presente no citoplasma bacteriano. Acredita-se que para que ela possa ser liberada, é necessária a atuação de uma autolisina conhecida como Lyt A (FIGURA 1) (HIRST et al., 2004; LOPEZ et al., 1997). Suas oligomerases formam na membrana da célula alvo um grande poro transmembrânico em forma de anel, com 260 Å de diâmetro e aproximadamente 40 subunidades monoméricas (KADIOGLU et al., 2004, 2008), responsáveis pela atividade citolítica da toxina e atividade modulatória celular, inibindo o batimento ciliar do epitélio respiratório e do epêndima cerebral, a atividade bactericida dos neutrófilos, a indução da síntese de citocinas (TNF e IL -1β) e a ativação de células T CD4 (KADIOGLU et al., 2008).

Recentemente foi reconhecido que o TLR4 é capaz de interagir com a pneumolisina e promover a resposta imune através do estímulo da produção de citocinas por macrófagos e células dendríticas (MCNEELA et al., 2010). Camundongos mutantes deficientes para TLR4 foram mais suscetíveis a doenças pneumocócicas e mortes causadas por cepa selvagem de pneumococo quando comparados com camundongos controle (MALLEY et al., 2003).

Kadioglu et al. (2008) sugerem em estudos *in vitro* que cepas do tipo selvagem de pneumococo na presença de pneumolisina obtiveram maior sucesso na colonização da nasofaringe quando comparadas com mutantes defectivos para essa proteína, que foram menos capazes de aderir às células epiteliais (HIRST et. al., 2004). Vários autores afirmam que essa proteína atua de forma diferente em diferentes sorotipos, mas é consensual sua atuação no processo de colonização da nasofaringe do hospedeiro (KADIOGLU et al., 2002). Na pneumonia pneumocócica, foi sugerido que a presença da pneumolisina aumente o fluxo de neutrófilos e produção de citocinas, ocasionando aumento do processo inflamatório e maiores danos ao tecido do hospedeiro (GUNN; NUNGESTER, 1933; HIRST et. al., 2004). Estudos utilizando modelos animais, conduzidos por Hirst et al. (2004), sugerem que a infecção por cepa selvagem de pneumococo no sistema nervoso central de ratos foi capaz de causar meningite em 26 horas, levando à hipertrofia e danos no epêndima e astrócitos. Por outro lado, cepas mutantes isogênicas deficientes de pneumolisina e autolisina causaram um quadro de infecção leve ou não induziram à doença.

Todos esses dados reafirmam a importância da pneumolisina como um dos principais fatores de virulência de *S. pneumoniae*, comum a todos os sorotipos (BERRY et al., 1989; HIRST et. al., 2004).

1.3.2.2 PROTEÍNA A DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO (PspA)

A proteína A de superfície de pneumococo (PspA) (FIGURA 1) é um fator de virulência exposto, presente em todos os isolados descritos de *S. pneumoniae.* Apresenta variabilidade em sua sequência, porém com mesma estrutura básica e massa molecular, que varia de 67 a 99 KDa (JEDRZEJAS et al., 2001).

A PspA é constituída por 5 domínios: peptídeo sinal; domínio alfa-hélice; domínio rico em prolina; domínio ligado a colina e cauda curta C-terminal (HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000).

O domínio alfa-hélice compreende 40% da região N-terminal da molécula e sua porção positiva parece interagir com a carga negativa do polissacarídeo capsular, enquanto sua porção negativa é repelida pelo polissacarídeo. Assim, o domínio alfa-hélice ganha uma forma estendida na superfície do pneumococo e expõe uma porção PspA na superfície da bactéria (HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000).

Em seguida à região α-hélice aparece o domínio rico em prolina, seguido por um domínio com 10 repetições de uma sequência de 20 aminoácidos (*domínios ligados à colina*). Essas sequências repetidas são responsáveis pelo ancoramento da proteína na superfície bacteriana (YOTHER; WHITE, 1994).

Devido à variabilidade da região N-terminal (exposta para o exterior da capsula bacteriana), foi proposta uma classificação que divide as moléculas de PspA em três famílias, que podem ser identificadas com antissoros específicos. Dentro dessas três famílias estão agrupados seis diferentes clados. A família 1 é composta pelos clados 1 e 2; a família 2 pelos clados 3, 4 e 5 e a família 3 pelo clado 6 (raramente isolado) (HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000). Mais de 90% das PspAs isoladas clinicamente são encontradas entre as famílias 1 e 2 das cepas de *S.pneumoniae* (BRANDILEONE et al., 2004).

A PspA desempenha diferentes ações de proteção do pneumococo durante a invasão: previne a ação da apolactoferrina na depleção de ferro e interfere na fixação do

componente C3 do complemento, bloqueando a opsonização e a quimiotaxia dos fagócitos (TU A-HT et al., 1999). Em camundongos, foi capaz de induzir imunidade protetora contra bacteremia, sepsis, pneumonia e estado de portador nasal, após desafio com pneumococos de diferentes sorotipos capsulares (BRILES, 2000a, 2000b; TAI, 2006). A PspA foi avaliada como candidata vacinal em ensaio clínico de Fase I, tendo apresentado resultados promissores (BRILES et al., 2000b).

1.3.2.3 PROTEÍNA C DE SUPERFÍCIE (PspC)

A proteína C de superfície de pneumococos (PspC) (FIGURA 1) é uma proteína polimórfica, presente em 75% dos isolados de *S. pneumoniae*. Apresenta domínios estruturais similares à PspA, incluindo a domínio alfa-hélice, seguido pelo domínio rico em prolinas e domínio ligado à colina (BROOKS-WALTER et al., 1999; KADIOGLU et al., 2008).

A PspC possui uma capacidade de ligar-se ao fator H, um regulador negativo da via alternativa de ativação do complemento, prevenindo a formação de C3b e evitando a opsonização pneumocócica (BROOKS-WALTER et al., 1999; KADIOGLU et al., 2008). Trabalhos recentes reportaram a ligação dessa molécula ao receptor polimérico de imunoglobulina, promovendo a migração do pneumococo através do epitélio da nasofaringe. Um mutante defectivo de PspC liga-se bem menos ao epitélio celular e ao ácido siálico *in vitro* e induz reduzida colonização nasofaringeal, comparativamente ao tipo selvagem (KADIOGLU et al., 2008).

1.3.2.4 ANTÍGENO A DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO (PsaA)

A colonização assintomática por *S. pneumoniae* no trato respiratório superior está relacionada com a ligação deste patógeno a carboidratos da superfície celular (N-acetil-glicosamina) do hospedeiro. A aderência a esses açúcares é mediada pela ligação de proteínas de superfície do tipo adesinas, tais como o antígeno A de superfície de pneumococo (PsaA) (FIGURA 1). Essas proteínas também contribuem para a hidrofobicidade e característica eletrostática do pneumococo, auxiliando na sua aderência ao epitélio celular do hospedeiro através de interações físico-químicas não específicas (BOGAERT; GROOT;

HERMANS, 2004). Esse tipo de colonização nasofaríngea é o principal reservatório para a transmissão entre os indivíduos (KADIOGLU et al., 2008).

A PsaA é uma lipoproteína altamente conservada, de 37-kDa, envolvida no transporte de manganês e zinco dentro da bactéria. Apesar de sua localização na membrana plasmática, parece estar envolvida na adesão à N-acetil-glicosamina nas células endoteliais do hospedeiro graças a mudanças de fase da bactéria, que reduz a espessura da cápsula, permitindo sua maior exposição durante a colonização (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004). A imunização intranasal com PsaA recombinante foi capaz de reduzir a colonização por pneumococos virulentos, além de proteger contra otite média (BRILES et al., 2000c).

1.3.2.5 AUTOLISINA (LytA)

LytA (FIGURA 1) é uma autolisina de peptidoglicano (N-acetil-muramoil-1-alanina amidase) que degrada a parede celular, promovendo autólise bacteriana (HIRST et al., 2004). Cepas mutantes deficientes em autolisina apresentaram virulência reduzida em modelo animal de pneumonia e bacteremia (BERRY; PATON, 1989; 2000; 2000). A contribuição da LytA na virulência é mediada, em parte, pela sua função na liberação de pneumolisina, peptidoglicano e ácidos teicóicos das células bacterianas lisadas (KADIOGLU et al., 2008).

1.3.2.6 NEUROAMINIDASES

As neuroaminidases, também conhecidas como sialidases, clivam resíduos de ácido siálico de glicoproteinas, glicolipídios e oligossacarídeos de superfície celular, conferindo uma vantagem competitiva ao pneumococo (KADIOGLU et al., 2008), pois diminuem a viscosidade do muco, expondo receptores de N-acetil-glicosamina (GlcNAc) das células epiteliais, que podem interagir com as proteínas de superfície do pneumococo. A atividade de neuroaminidases de vírus tais como influenza e parainfluenza, pode contribuir para o aumento da adesão de pneumococos observada durante as infecções virais (MCCULLERS; TUOMANEN, 2001).

1.4 VACINAS PNEUMOCÓCICAS

Desde 1977 alguns dos sorotipos prevalentes em doenças pneumocócicas têm sido utilizados no desenvolvimento de vacinas com polissacarídeos capsulares (VPC) (ARDANUY et al. 2012). A partir da implantação dessas vacinas (TABELA 1) têm ocorrido mudanças significativas na incidência, distribuição de sorotipos e resistência à penicilina ao longo dos anos para doenças invasivas pneumocócicas.

TABELA 1: Vacinas pneumocócicas **Fonte:** GRABENSTEIN & KLUGMAN, 2012.

Manufacturers (trade names)	Valence: serotypes included	Date introduced, initial region
Pneumococcal polysaccharide vaccines		
Merck Sharp & Dohme (MSD) (Pneumovax™)	14-valent: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9N, 12F, 18C, 19F, 23F, 25F	November 1977, USA
Lederle Laboratories (Pnu-Imune™)		August 1979, USA
Institut Mérieux (Imovax Pneumo 14™)		February 1981, France
SmithKline Beecham (Moniarix™)	17-valent: 1, 2, 3, 4, 6A, 7F, 8, 9N, 11A, 12F, 14, 15F, 17F, 18C, 19F, 23F, 25	1980s, Europe
Merck Sharp & Dohme (MSD) (Pneumovax™ 23)	23-valent: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F	July 1983, USA
Lederle Laboratories (Pnu-Imune™ 23)		July 1983, USA
Institut Mérieux (Pneumo 23™)		1987, Europe
Chengdu Institute of Biological Products		2005, China
Pneumococcal conjugate vaccines		
Wyeth Laboratories (Prevnar™ or Prevenar™)	7-valent: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	February 2000 for infants, USA and Europe
GlaxoSmithKline (Synflorix™)	10-valent: 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	March 2009 for infants: Europe
Wyeth Laboratories (Prevnar™ 13 or Prevenar™ 13)	13-valent: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F	February 2010 for infants, late 2011 for adults, Europe, Australia, USA

Atualmente, a VPC 23-valente, Pneumovax 23, produzida pelo laboratório Merck Research, EUA, está sendo distribuída em substituição à vacina 14- valente lançada em 1977. Essa vacina contém 23 antígenos polissacarídicos capsulares purificados (sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F), correspondendo a 85-90% das doenças pneumocócicas (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004). Vários estudos têm demonstrado seu efeito protetor em adultos e crianças acima de dois anos, incluindo também grupos de risco, como idosos e portadores de doença obstrutiva pulmonar crônica. Porém, para crianças menores de dois anos, onde as taxas de colonização são elevadas e em indivíduos imunocomprometidos, a vacinação com a VPC 23-valente tem demonstrado eficiência protetora bastante reduzida (O'BRIEN, et al., 1996). Essas vacinas induzem uma resposta imune T- independente, ou seja, são capazes de ativar células B na ausência de células T auxiliares. Dessa forma, explica-se porque em crianças

menores de dois anos a vacinação com VPC torna-se ineficaz, tendo em vista que durante essa fase do desenvolvimento, a zona marginal do baço ainda se apresenta imatura e sem a presença de alguns receptores importantes no desencadeamento da resposta imune (GRANOFF et al., 1998; HENDLEY et al., 1987; PLETZ et al., 2008).

A nova geração de vacinas pneumocócicas inclui as vacinas conjugadas (Tabela 1), onde os polissacarídeos são ligados a proteínas. Essas formulações induzem a uma resposta imune T-dependente e geração de células de memória. Vários estudos têm demonstrado alta eficiência da vacina conjugada 7-valente (PCV7) na prevenção de doenças pneumocócicas invasivas referentes aos sete sorotipos incluídos na vacina. Contudo, uma proteção eficaz ainda depende da área geográfica onde os sorotipos presentes na vacina tenham potencial de cobertura. Dessa forma, apesar da PCV7 induzir cobertura por volta de 85% nos EUA, na Europa está em torno de 60-70% e na Ásia é de aproximadamente 55% (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004; DAGAN, 2003; TAI, 2006).

A vacina pneumocócica 10-valente (PCV10) Synflorix, produzida pela GlaxoSmithKline (GSK) e licenciada em 2009, contém os sorotipos 1, 5 e 7F além dos sete que compõem a PCV7 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). Oito dos 10 sorotipos da PCV10 são conjugados com a proteína D de *H. influenzae*, uma lipoproteína de superfície celular altamente conservada (DAGAN; POOLMAN, 2010). Dados da OMS sugeriram que a mudança da PCV7 para PCV10 aumentaria a cobertura vacinal de 86% para 88% nos EUA e de 74% para 84% na Europa. No continente africano a cobertura iria de 67% para 81%, na Ásia de 43% para 66% e no Brasil de 60% para 80% (WHO, 2007). No entanto nos EUA, a PCV10 não foi implantada devido à rápida emergência do sorotipo 19A, sendo substituída pela PCV13 (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010).

Em 2010 foi licenciada a vacina conjugada 13-valente (PCV13), Prevenar 13 (Wyeth), contendo todos os sorotipos encontrados na PCV7 (sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, e 23F) com adição de outros seis (1, 3, 5, 6A, 7F e 19A). A PCV13 foi desenvolvida para resolver a necessidade de proteção contra sorotipos de pneumococo ausentes na PVC7, que emergiram como causas comuns de infecção em crianças. Uma análise de vigilância epidemiológica de 2008 constatou que 43% dos casos de infecções pneumocócicas em crianças nos EUA foram causados pelo sorotipo 19A, seguidos dos sorotipos 7F e 3 como segunda e terceira causas mais comuns (KAPLAN et al., 2010; SUCHER et al., 2011).

Devido à limitação na cobertura promovida pelos sorotipos presentes nas vacinas conjugadas, tem sido relatado o aumento na incidência de sorotipos ausentes na vacina, provavelmente devido à pressão imunológica seletiva (KAPLAN et al., 2004; O'BRIEN; SANTOSHAM, 2004; TAI, 2006). Além disso, a produção dessas vacinas é bastante onerosa, pois envolve vários processos de fermentação, purificação e conjugação dos diversos sorotipos constituintes da vacina, o que torna o processo inviável para países em desenvolvimento (TAI, 2006).

Alternativas para a prevenção da infecção pneumocócica têm sido o desenvolvimento de vacinas dirigidas contra antígenos proteicos comuns a todos os sorotipos de pneumococos, presumindo-se uma resposta imune envolvida na proteção ou atenuação dos sintomas contra a doença. Uma importante limitação, entretanto, seria a diversidade entre os vários sorotipos de pneumococos. A proteína ideal deveria ser comum aos 93 diferentes sorotipos e apresentar diversidade antigênica limitada. Algumas proteínas candidatas formam a base para a terceira geração de vacinas pneumocócicas: Proteína C de superfície de pneumococo (PspC), Pneumolisina, Neuraminidase A (NamA), Antígeno A de superfície de pneumococo (PsaA) e a Proteína A de superfície de pneumococo (PspA). Dentre essas proteínas, a PspA apresenta os resultados mais promissores, tendo inclusive sido utilizada com sucesso em ensaio clínico de Fase I (BRILES et al., 2000b). Essas vacinas poderiam levar a uma proteção efetiva, além de induzirem uma resposta dependente de células-T e memória imunológica.

Dessa forma, vários estudos têm sido conduzidos visando ao desenvolvimento de novas vacinas pneumocócicas, capazes de promover cobertura eficaz a todas as faixas etárias e grupos de risco. Nesse sentido, vem sendo desenvolvida, no Instituto Butantan uma Vacina Pneumocócica Celular (WCPV), um projeto em colaboração com o Children's Hospital - Harvard School of Public Health, Harvard University, USA and PATH (Program for Appropriate Technology in Health), USA. Produzida a partir de cepa não capsulada de *S. pneumoniae*, inativada por tratamento com etanol, a imunidade conferida pela vacina é dirigida a vários antígenos de superfície, e não sorotipo-específica (GONÇALVES et al., 2013). Essa vacina está sendo avaliada em ensaio de campo em humanos nos USA, pelo Food and Drug Administration (FDA).

1.5 DIAGNÓSTICO DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Apesar do *S. pneumoniae* ser um agente etiológico confirmado em dois terços dos casos (FINE, et al., 1996) também é a principal causa de pneumonia de etiologia desconhecida (RUIZ-GONZÁLEZ et al., 1999), indubitavelmente por limitações nos testes diagnósticos convencionais.

As técnicas utilizadas no isolamento e identificação de pneumococos no sangue e líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite não são recentes. Apesar de apresentarem comprovada utilidade, fácil desenvolvimento e reprodutibilidade nos resultados, requerem uma gama variada de adequações laboratoriais.

Estudos sugerem que nas ultimas três décadas tem havido uma diminuição na recuperação de *S.pneumoniae* em amostras clínicas de pacientes internados com pneumonia adquirida na comunidade, ocasionando um retrocesso no diagnóstico e recuperação deste patógeno. Dados do Johns Hopkins Hospital (Baltimore, MD - USA) exemplificam essa tendência de queda nos registros de diagnóstico: em 1970 a recuperação do patógeno em amostras de pacientes era de 60% nos casos de pneumonia pneumocócica, enquanto que em 1991 só chegava a 18% (BARTLETT, 2004; MUNDY et al., 1995).

A perda da qualidade na obtenção e identificação dos isolados clínicos pode estar relacionada a pressões econômicas para redução de custos e terceirização dos laboratórios, acarretando atrasos e manipulação incorreta das amostras e prejudicando o diagnóstico final do patógeno (BARTLETT, 2004). Em países em desenvolvimento e comunidades isoladas, esse problema torna-se ainda mais grave, pela falta de laboratórios equipados e profissionais da saúde devidamente treinados. Esses problemas contribuem em parte para o surgimento de cepas multirresistentes a antibióticos, pois segundo dados de Wannmacher 2004, muitos fatores contribuem para prescrição inadequada de antibióticos aos pacientes:

- prescrição de antibióticos para infecções virais;
- prescrição de antibióticos inadequados para o tratamento do patógeno;
- pacientes não respeitam horários ou dosagem, ou interrompem o tratamento antes do estabelecido pelo médico;
- pacientes se automedicam ou compartilham o antibiótico com familiares e amigos.

Dessa forma, a baixa qualidade na obtenção de amostras e o uso prévio de antibióticos dificultam o diagnóstico do patógeno, reduzindo significativamente a probabilidade de seu isolamento em amostras clínicas (WERNO; MURDOCH, 2008).

Apesar da importância clínica do isolamento de *S. pneumoniae*, não há um "padrão ouro" ou método de referência para a sua identificação (BLASCHKE, 2011). Os valores de sensibilidade e especificidade variam muito em relação aos diferentes métodos. Para a identificação final de um isolado clínico da bactéria é necessário um conjunto de testes, abrangendo a morfologia das colônias e coloração de Gram, hemólise, solubilidade em desoxicolato, susceptibilidade à optoquina e teste de coaglutinação (BROWNE; MIEGEL; STOTTMEIER, 1984; DAVIS et al., 1992; GARDAM; MILLER, 1998).

1.5.1 MICROSCOPIA E CULTURA

A identificação laboratorial de isolados de *S.pneumoniae* depende do reconhecimento das características morfológicas típicas por microscopia e testes fenotípicos. No entanto, aparências típicas podem ser alteradas por antibioticoterapia e a descoloração do corante pode dar a falsa impressão de diplococos gram-negativos (WERNO; MURDOCH, 2008).

1.5.2 REAÇÃO DE QUELLUNG

Embora pouco utilizada atualmente, a reação de Quellung é o método mais específico para detecção de pneumococo a partir de amostras puras de cultura de escarro. Após a reação do pneumococo com soro anticapsular, a cápsula bacteriana fica rodeada por um halo. Embora essa reação seja considerada altamente específica para pneumococo, reações cruzadas podem ocasionar resultados falso-positivos e cepas não capsuladas podem produzir resultados falso-negativos (AUSTRIAN, 1976). Também há a necessidade de se obter microrganismos viáveis em amostras de sangue e a obtenção dos resultados é demorada (ARAI et al., 2001).

1.5.3 SUSCETIBILIDADE À OPTOQUINA E SOLUBILIDADE EM BILE

A diferenciação laboratorial entre o *S.pneumoniae* e o *S. viridans* é normalmente realizada por duas reações: suscetibilidade à optoquina e solubilidade em bile. Isolados de pneumococo são tipicamente suscetíveis à optoquina e solúveis em bile, enquanto que *S. viridans* são tipicamente resistentes à optoquina e insolúveis em bile. O teste de solubilidade em bile é baseado na autólise do *S.pneumoniae* na presença do agente tensoativo desoxicolato de sódio (KELLOGG et al., 2001). Embora o teste seja considerado sensível e específico para a identificação, há constatação de que até 10% dos isolados de *S. pneumoniae* podem ser resistentes à optoquina (DENYS et al., 1992; KELLOGG et al., 2001).

1.5.4 HEMOCULTURAS

O isolamento de *S.pneumoniae* a partir de cultura de sangue fornece um diagnóstico definitivo da doença pneumocócica. No entanto, a bacteremia documentada a partir de hemoculturas ocorre em apenas um quarto dos casos e a antibioticoterapia prévia reduz significativamente esse número (MUSHER, 1992). Além disso, o *S. pneumoniae* pode liberar autolisina durante a fase estacionária de crescimento, resultando em morte celular e impossibilitando o correto diagnóstico (PETTI; WOODS; RELLER, 2005).

1.5.5 EXAME DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Para o diagnóstico de meningite pneumocócica, a combinação de cultura bacteriana e coloração de Gram de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) possuem uma sensibilidade de 84% e especificidade de 98%, mas a administração prévia de antibióticos pode reduzir significativamente a detecção do patógeno (GEISELER et al., 1980).

1.5.6 EXAME DE ESCARRO

No diagnóstico de pneumonia pneumocócica, o exame de escarro é feito por coloração de Gram, para identificação dos diplococos Gram positivos e contagem de células polimorfonucleares (PMN). A presença de 10 PMN para cada célula escamosa epitelial é sugestivo de pneumonia pneumocócica, porém o método é limitado para ser realizado em crianças, por não produzirem escarro. Em adultos é um método diagnóstico bastante eficaz,

capaz de detectar a pneumonia bacteriana desde que as amostras sejam coletadas e processadas corretamente e que sejam obtidas antes da administração de antibióticos ou até 24 horas após o início do tratamento (MUSHER et al., 2004; WERNO; MURDOCH, 2008).

1.5.7 EXAME DE ASPIRADO PULMONAR

O aspirado pulmonar é um método capaz de melhorar a eficácia no diagnóstico de pneumonia pneumocócica, principalmente em pacientes com lesões periféricas e crianças, porém não é amplamente adotado devido à sua natureza invasiva e à necessidade de ser realizado por profissionais da saúde bastante experientes (DORCA, 1995; WERNO; MURDOCH, 2008).

1.5.8 AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX

Ensaios de aglutinação em látex para detecção de *S. pneumoniae* em amostras de LCR apresentam sensibilidade elevada, e embora possam levar a alta porcentagem de resultados falso-positivos, especialmente em amostras de urina, ainda são importantes para o diagnóstico de pneumonia pneumocócica e meningite em comunidades com instalações laboratoriais limitadas (NUNES et al, 2004; PERKINS, et al, 1995; WERNO; MURDOCH, 2008).

1.5.9 DETECÇÃO MOLECULAR

Os métodos moleculares, tais como PCR (polymerase chain reaction), tem se estabelecido como importante ferramenta de diagnóstico de *S. pneumoniae*, pois possuem algumas vantagens em relação à maioria dos métodos convencionais, dentre as quais: podem detectar a presença do microrganismo a partir de quantidades mínimas de ácidos nucléicos; não necessitam de amostras viáveis; são técnicas menos afetadas pela terapia antimicrobiana; fornecem resultados dentro de curto espaço de tempo. Contudo, sua sensibilidade pode variar de 29% a 100%, devido à manipulação inadequada, quantidade insuficiente de amostra ou escolha inapropriada do gene, resultando em reação cruzada com outros patógenos (LAHTI et al., 2006; RUDOLPH et al., 1993; WERNO; MURDOCH, 2008).

A utilização dessas técnicas também exige laboratório bem equipado e presença de profissionais capacitados, o que ainda não é uma realidade para muitos países em desenvolvimento ou em comunidades isoladas.

1.5.10 TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS RÁPIDOS

Os testes imunocromatográficos rápidos são também conhecidos como imunoensaios de "*dipstick*", "*strip tests*" e imunoensaios por fluxo lateral.

Essa técnica foi descrita pela primeira vez em 1960 e sua primeira aplicação comercial foi para testes de gravidez, em 1988. Atualmente são utilizados em análise qualitativa, quando o resultado baseia-se em negativo/positivo ou inválido, ou quantitativa, baseada em determinação numérica ou de unidades (MILLIPORE, 2008) para detecção de vários agentes, incluindo pequenas moléculas inorgânicas, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos em fluídos biológicos. São importantes para o diagnóstico de gravidez, infecção ou contaminação com patógenos específicos, incluindo a presença de compostos tóxicos em alimentos ou no meio ambiente, além de facilitar a detecção de drogas ilícitas (GEERTRUIDA et al., 2009). São relativamente baratos para produção, têm uma vida útil longa, não necessitam de refrigeração durante a armazenagem, não requerem nenhum equipamento de laboratório sofisticado ou pessoas altamente capacitadas e os resultados são obtidos geralmente em 10-20 minutos. (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011; MILLIPORE, 2008; O'FARRELL, 2009).

Devido a essas propriedades tem aumentado no decorrer das décadas pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de ensaios de fluxo lateral que atendam aos requisitos de vários segmentos de mercado (FIGURA 2).

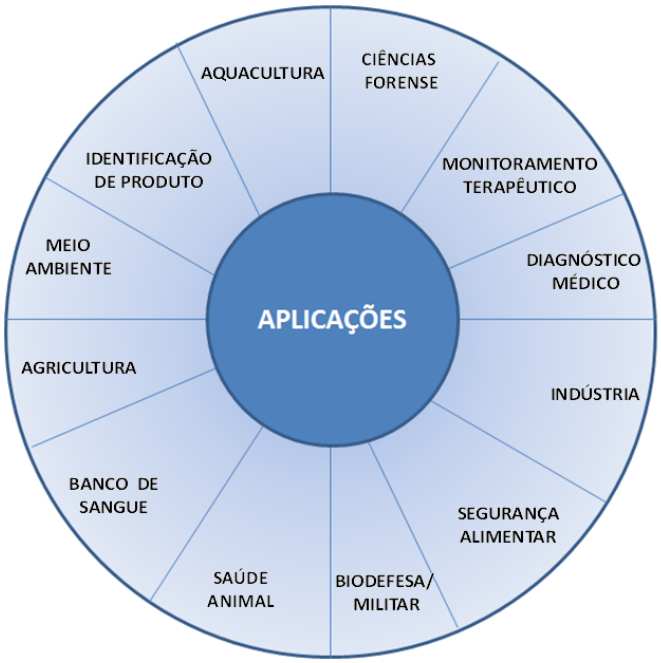

FIGURA 2: Lista dos segmentos de mercado em que os imunoensaios *Dipsticks* já estão em produção ou em desenvolvimento. Adaptado de: WONG e TSE (2009)

O método pode ser direto (sanduíche) ou competitivo (indireto). Os ensaios diretos são normalmente usados quando o teste é para detecção de analitos maiores com múltiplos sítios antigênicos, tais como gonadotrofina coriônica humana (HCG), vírus da dengue ou HIV. Já os ensaios competitivos são tipicamente utilizados quando o objetivo é a detecção de pequenas moléculas com determinantes antigênicos únicos, que não podem ligar-se simultaneamente a dois anticorpos (O'FARRELL, 2009).

Foi descrito um método direto para detecção de Polissacarídeo C de *S. pneumoniae* na urina, o Binax NOW (Binax, Inc., Portland, ME). É um teste rápido, utilizado comercialmente, não invasivo e o resultado pode ser obtido em 15 minutos (DOMÍNGUEZ, 2001; GUTIERREZ, 2003; WERNO; MURDOCK, 2008). Este teste tem mostrado boa utilidade para o diagnóstico de pneumonia pneumocócica, e de acordo com relatos da literatura, sua sensibilidade varia de 77% - 88% e a especificidade está em torno de 67%-100% na detecção de infecções pneumocócicas em adultos (GUTIERREZ et al., 2003). No entanto, o Binax NOW, possui limitações quanto ao seu uso em crianças, pois nesta população a detecção de antígenos pneumocócicos na urina é bastante provável devido à condição de portador do pneumococo, diminuindo a especificidade devido à proporção de testes falso-positivos. O

teste pode também reagir de forma cruzada com outros grupos de estreptococos (BLASCHKE, 2011; KLUGMAN; MADHI; ALBRICH, 2008).

2 JUSTIFICATIVA DO PROJETO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o desenvolvimento de diagnósticos rápidos, práticos, sensíveis, específicos e de baixo custo como estratégia essencial no processo de otimização dos sistemas de saúde pública e no controle de epidemias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). Nesse contexto, testes imunocromatográficos rápidos (*dipsticks*) são uma alternativa aos métodos tradicionais de identificação de patógenos e moléculas antigênicas, pois envolvem tecnologia relativamente simples de reação antígeno-anticorpo em uma única fase sólida, com desenvolvimento a temperatura ambiente e de fácil manipulação pelo agente de saúde. Esses testes são usualmente sensíveis, específicos e de baixo custo, não exigindo equipamento ou treinamento específico e o resultado pode ser obtido em aproximadamente 15 minutos, possibilitando uma intervenção clínica imediata.

O desenvolvimento de metodologia rápida e sensível para o diagnóstico de *S. pneumoniae*, considerando antígenos proteicos de superfície conservados, independentemente do sorotipo ditado pelo polissacarídeo capsular, seria de grande valia não só no diagnóstico etiológico, mas também na avaliação da circulação da bactéria em estudos epidemiológicos. O diagnóstico rápido desse importante agente patogênico, com metodologia simples e de baixo custo é uma proposta de grande utilidade em saúde pública, principalmente para países onde tecnologias mais sofisticadas são inacessíveis.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é a padronização de um ensaio imunocromatográfico rápido para diagnóstico de *S. pneumoniae*, utilizando anticorpos monoclonais e soros policlonais específicos, conjugados a partículas coloidais coloridas, para visualização da reação.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(i) Avaliar *dipsticks* confeccionados com membranas de nitrocelulose:

a) Com diferentes porosidades;

b) Utilizando anticorpos monoclonais anti-pneumolisina recombinante como anticorpo de captura;

(ii) Avaliar dipsticks confeccionados com conjugados utilizando:

Diferentes marcadores coloridos - Corantes Têxteis; Microesferas Coloidais Coloridas ou Nanopartículas de Ouro Coloidal, conjugados a diferentes anticorpos secundários:

a) Soros policlonais anti-pneumolisina recombinante

b) Soros policlonais anti-vacina pneumocócica celular

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRINCIPIO E DESENVOLVIMENTO DO TESTE DE *DIPSTICK*

Testes imunocromatográficos rápidos (*dipsticks*) têm sido amplamente utilizados para diagnóstico de gravidez e na detecção de infecção ou contaminação com patógenos, compostos tóxicos em alimentos e drogas ilícitas. Esses testes, utilizando uma reação imunocromatográfica por migração lateral, são de fácil execução, baixo custo e dispensam equipamentos e aparatos laboratoriais sofisticados e pessoal técnico especializado, tendo sido sugeridos como alternativa aos imunodiagnósticos convencionais, em diversas patologias.

***Componentes do teste* (FIGURA 3):**

(i) FASE SÓLIDA: membrana de nitrocelulose (MN) com **ANTICORPO DE CAPTURA** imobilizado, constituindo a linha teste do dispositivo, onde ocorre a reação;

(ii) PORÇÃO DO CONJUGADO (*conjugate pad*) - para aplicação do anticorpo de detecção, conjugado à partícula corada. É uma membrana de fibra de vidro onde se aplica o anticorpo já conjugado, um anticorpo monoclonal (AcM) ou um soro policlonal (AcP) produzido contra o analito em questão e conjugado a uma partícula reveladora corada;

(iii) PORÇÃO DA AMOSTRA (*sample pad*): um filtro de celulose, em uma das extremidades da MN, para deposição da amostra clínica contendo o analito;

(iv) PORÇÃO ABSORVENTE - filtro de celulose, colocado na MN, na extremidade oposta à porção da amostra, que auxilia no fluxo contínuo do complexo imune (FIGURA 4) formado pelo antígeno capturado pelo ANTICORPO DE DETECÇÃO conjugado com a partícula corada.

O teste baseia-se em uma imunocromatografia do tipo direto, que se desenvolve na MN, fixa sobre um suporte inerte (FIGURA 4). O *dipstick* é colocado em contato com a amostra clínica com o analito e na medida em que a amostra é absorvida pela PORÇÃO ABSORVENTE e flui ao longo da MN, o analito interage primeiramente com o ANTICORPO DE DETECÇÃO, conjugado à partícula corada (Figura 4A), formando um complexo antígeno-

anticorpo (Figura 4B). O complexo imune corre pela MN, sendo imobilizado por um ANTICORPO DE CAPTURA na linha-teste, indicando a presença do analito (Figura 4C). O excesso de conjugado não complexado ao analito é capturado por anticorpos presentes na linha-controle, contendo IgG contra o anticorpo de detecção, formando uma segunda linha corada, como controle da reação (Figura 4C). Duas linhas visíveis no dipstick (teste e controle) indicam resultado positivo e somente na linha controle, resultado negativo. Os resultados podem ser visualizados entre 10 e 20 minutos.

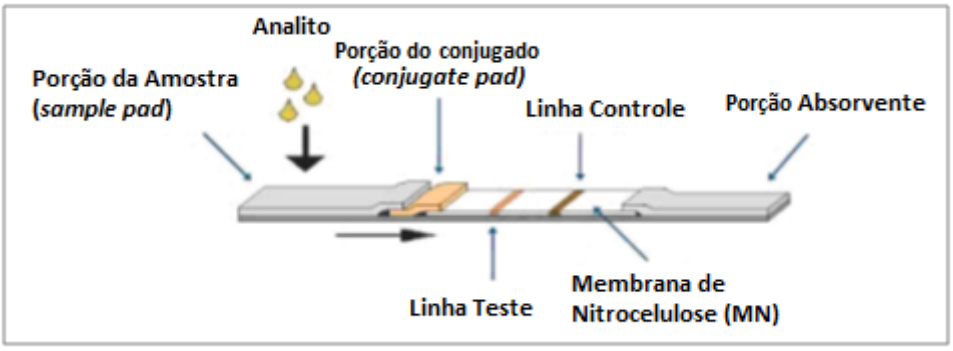

FIGURA 3: Componentes do *Dipstick* - Adaptado de NGOM, 2010.

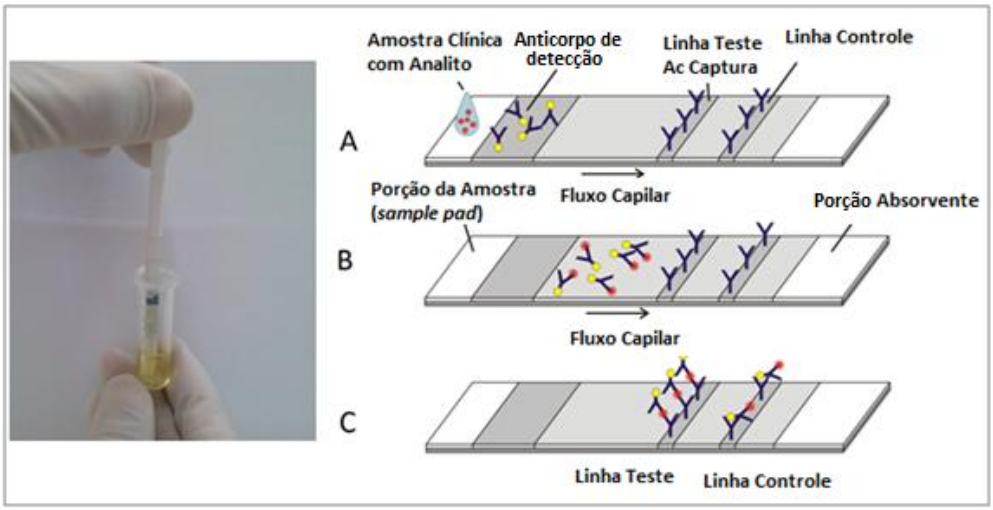

FIGURA 4: **Princípio do teste *Dipstick*. A)** Amostra clínica com o analito em solução aquosa é adicionada sobre a *Porção da Amostra*, entrando em contado com a membrana de fibra de vidro contendo o anticorpo de detecção conjugado ao corante; **B)** Ocorre a formação de um imunocomplexo analito-anticorpo conjugado que flui sobre a membrana de nitrocelulose; **C)** O complexo analito-anticorpo conjugado é capturado na linha teste por um anticorpo de captura específico, formando uma linha visível. O excesso de complexo

antígeno-anticorpo conjugado é capturado na linha controle, contendo IgG específico contra o anticorpo de detecção.

Neste trabalho, para a confecção dos *dipsticks* foram avaliadas três diferentes partículas coloidais coradas, conjugadas aos anticorpos de detecção:

1 – Corante têxtil Dystar© (Dystar, São Paulo, SP, Brasil)**;**

2– Microesferas coloridas Estapor® (Merck, Damstadt, Alemanha);

3 – Nanopartículas de ouro (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA ou BBInternational, Cardiff, Inglaterra**).**

4.2 ANTICORPOS DE DETECÇÃO

Foram utilizadas como anticorpos de detecção, conjugados às partículas coradas, imunoglobulinas de camundongo obtidas a partir de soros de animais imunizados com antígenos de *Streptococcus pneumoniae*:

- ✓ Pneumolisina recombinante (Ply) - fornecida gentilmente pela Dra. Luciana C.C. Leite, Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia – Instituto Butantan.
- ✓ Vacina Pneumocócica Celular (WCPV) - obtida a partir do cultivo e processamento da cepa vacinal de *Streptococcus pneumoniae* Rx1E PdT ΔlytA (projeto em colaboração com o Dr. Richard Malley - Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston) no Laboratório Piloto Especial de Produtos Biológicos Recombinantes – Instituto Butantan, em condições GMP (GONÇALVES et al., 2013).

Anticorpos de detecção obtidos a partir de soro policlonal anti-Ply e anti-WCPV foram previamente produzidos em nosso laboratório, conforme esquema de imunização e precipitação de imunoglobulinas descritas no item a seguir.

As técnicas de manipulação e experimentação com animais utilizados neste estudo foram previamente aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), conforme protocolo n° 810/11.

4.2.1 ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO

Camundongos Balc/ c fêmeas com oito semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, foram imunizados por via subcutânea com duas doses de 200 µl de Ply (10 µg/dose com hidróxido de alumínio 1,2 mg/ml) com 14 dias de intervalo. O mesmo esquema foi utilizado para imunização com a vacina pneumocócica celular (WCPV) (Lote 005-09; Estoque: 12,25 µg/ml; uso: 10 µg/dose com hidróxido de alumínio 1,2 mg/ml).

No 15° dia após a 2ª imunização, foi realizada a sangria por punção retro orbital. Os soros obtidos (anti-Ply e anti-WCPV) foram armazenados a 4 °C até o uso.

4.2.2 PRECIPITAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS

Para a precipitação das imunoglobulinas (IgG) dos soros anti-Ply e anti-WCPV foi adicionada uma solução saturada de sulfato de amônio $(NH_4)2SO_4$ a 50%, volume a volume, sob agitação, por 16 horas a 4 °C. No dia seguinte as soluções foram centrifugadas a 5000 rpm por 30 minutos a 4 °C e os sobrenadantes desprezados. Os precipitados foram ressuspensos em 1 ml de PBS pH 7,2 e em seguida dialisados por 4 horas contra PBS para retirada do $(NH_4)2SO_4$ residual. Após a diálise, as soluções foram novamente centrifugadas a 5000 rpm por 30 minutos a 4 °C e em seguida foram coletados os sobrenadantes, onde se encontram as Igs. A concentração de Igs foi determinada por leitura de DO $_{280nm}$ (Hitachi U-1900 Spectrophotometer) e inferida pela seguinte fórmula:

DO = E x C x L

DO = Absorbância a 280 nm

E= Coeficiente de extinção das Igs = 1,4

C= Concentração de Igs no soro (mg/ml)

L = Light path (caminho percorrido pela luz no espectrofotômetro) = 1 cm

Portanto: C= D.O/1,4= xmg/ml

As Igs obtidas foram armazenadas a -20 °C até o uso. A partir deste item a denominação anti-Ply e anti-WCPV se refere às Igs obtidas, respectivamente dos soros anti-Ply e anti-WCPV.

4.3 ANTICORPOS DE CAPTURA

A seleção dos anticorpos de captura a serem utilizados nos *dipsticks* foi feita a partir de uma bateria de 18 anticorpos monoclonais (AcM): anti-pneumolisina recombinante (AcM anti-Ply) e anti-Proteína A de superfície de pneumococo (AcM anti-PspA 3 e AcM anti-PspA 2) (TABELA 2), gentilmente fornecidos pela Dra Farida Nato (Institut Pasteur – Plate-Forme 5, Paris – França). Esses anticorpos foram avaliados por ensaio imunoenzimático (ELISA), contra uma bateria de 84 suspensões bacterianas de *S. pneumoniae* obtida de isolados humanos de 21 diferentes sorotipos, gentilmente cedida pela Dra. Ana Lúcia S. Sgambatti de Andrade, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (TABELA 3).

TABELA 2: Anticorpos monoclonais

Anti pneumolisina	Anti PspA 3	Anti PspA 2
H1-42	A7-72	H5-4
B19-2	G15-85	I-23
E18-7	H8-76	
F8-8	J7-6	
D9-43	J8-13	
B7-16		
E10-24		
E14-6		
E17-17		
E24-6		
F6-16		

A preparação das amostras bacterianas para serem testadas contra os AcMs será descrita a seguir.

4.3.1 CULTIVO E ESTOCAGEM DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Os diferentes isolados de *S. pneumoniae* foram semeados em agar sangue 5% em base BHI e incubados por 14-16 h em atmosfera enriquecida de CO_2 a 36-37 °C. Em seguida o tapete celular foi ressuspendido com meio líquido Toddy Hewitt (THY) em tubo falcon de 45 ml (cultivo estático) e incubado em jarra de anaerobiose, a 37 °C. A densidade óptica (DO) foi medida de hora em hora a 600 nm. Ao atingir DO_{600nm} entre 0,6 e 0,7, o cultivo foi

centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em THY em 1/10 do volume original. Foi acrescentado glicerol esterilizado a 15%, a suspensão foi homogeneizada e dividida em alíquotas de 250 ml em criotubos estéreis. As amostras foram congeladas a -20 °C e depois a -80 °C, até o uso.

4.3.2 INATIVAÇÃO DAS CEPAS DE *S.PNEUMONIAE*

As suspensões bacterianas foram cultivadas em placas de agar BHI/sangue 5%, em ambiente anaeróbio a 37 °C. Após 48 horas, colônias isoladas foram repicadas em 15 ml de THY (anaerobiose, 37 °C). O crescimento de cada amostra foi acompanhado por DO_{600nm}. Quando as amostras alcançaram DO ≥ 0,3 foram inativadas com formaldeído 2% durante 16 horas, a temperatura ambiente e a seguir centrifugadas (10000 rpm, 10 min, 4 °C). Os sobrenadantes foram descartados, os pellets ressuspensos em 2% de tampão Sonrensen (KH2PO4 0,06 M + Na2HPO4 0,06 M + NaCL 0,9% + FORMALINA 37%) e mantidos a -4 °C até o uso em reações de ELISA, para serem avaliados contra diferentes anticorpos monoclonais.

4.3.3 AVALIAÇÃO DA BATERIA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA OS DIFERENTES ISOLADOS DE *S.PNEUMONIAE*

Os 18 anticorpos monoclonais foram avaliados contra as 84 cepas de *S. pneumoniae* (**TABELA 3)**, por ensaio imunoenzimático (ELISA), para definição dos anticorpos monoclonais capazes de identificar a maior variedade de cepas de *S. pneumoniae.*

TABELA 3: Isolados clínicos de *S.pneumoniae*

Cepa	Identificação	Sorotipo	Família	Clado	Cepa	Identificação	Sorotipo	Família	Clado
1	1079	1	F1	1	43	1149	19F	F2	4
2	69	10A	F1	1	44	1235	22F	F2	4
3	890	10F	F1	1	45	166	6A	F2	4
4	1151	11A	F1	1	46	46	6B	F2	4
5	172	14	F1	1	47	79	6B	F2	4
6	1161	14	F1	1	48	99	6B	F2	4
7	125	15B	F1	1	49	100	23F	F2	5
8	416	18C	F1	1	50	255	6A	F2	5
9	542	18C	F1	1	51	865	23F	F2	5
10	45	19F	F1	1	52	630	14	F1	1
11	47	23F	F1	1	53	33	18A	F1	1
12	109	23F	F1	1	54	83	19A	F1	2
13	200	6A	F1	1	55	29	23F	F1	2
14	468	6A	F1	1	56	5	11	F2	3
15	589	6A	F1	1	57	30	14	F2	3
16	938	6A	F1	1	58	1156	19F	F2	3
17	1164	6A	F1	1	59	10	3	F2	3
18	1185	6A	F1	1	60	24	6A	F2	3
19	12	6A	F1	1	61	1105	6A	F2	3
20	6	14	F1	1	62	25	6B	F2	3
21	94	19F	F1	2	63	36	6B	F2	3
22	854	19F	F1	2	64	1148	6B	F2	3
23	83	3	F1	2	65	107	9N	F2	3
24	113	6A	F1	2	66	120	9N	F2	3
25	741	6B	F1	2	67	180	9N	F2	3
26	231	6A	F1	1	68	1153	9V	F2	3
27	122	10A	F2	3	69	10	3	F2	3
28	726	10A	F2	3	70	195	18A	F1	1
29	762	14	F2	3	71	13	9V	F1	1
30	182	18A	F2	3	72	755	14	F1	2
31	947	19A	F2	3	73	540	6A	F1	2
32	539	19F	F2	3	74	1224	6B	F2	3
33	783	19F	F2	3	75	358	7F	F2	3
34	212	23F	F2	3	76	1163	7F	F2	3
35	767	6A	F2	3	77	414	10A	F2	4
36	891	6A	F2	3	78	26	14	F2	4
37	136	6B	F2	3	79	490	14	F2	4
38	979	7C	F2	3	80	1140	14	F2	4
39	41	9V	F2	3	81	770	18B	F2	4
40	146	9V	F2	3	82	743	18C	F2	4
41	199	19F	F2	4	83	40	19F	F2	4
42	562	19F	F2	4	84	101	19F	F2	4

Placas de microtitulação de poliestireno (Costar® 3590 da corning) foram sensibilizadas com 2,5 x 10^7 UFC por ml (ou 10 µg/ml de proteína, quando utilizados os lisados bacterianos) em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6 (50 µl por

poço). As placas foram incubadas a 4 °C por 16 horas e a seguir por 30 min a 37 °C. Após o período de incubação, as placas foram submetidas a quatro lavagens sucessivas com tampão Na2HPO$_4$ dibásico/KHPO$_4$ monobásico 1,5 mM, NaCl 1,37 mM, KCL 2,7 mM, pH 7,2 contendo 0,1% de Tween20. Em seguida foram adicionados 100 µl da solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 10% em água destilada), mantendo-se a 37 °C por 1 hora. Após novo ciclo de lavagens, aplicou-se 50 µl por poço dos anticorpos monoclonais em diluições seriadas em PBS, pH 7,4 contendo soroalbumina bovina 1% (PBS/BSA), incubando-se novamente a 37 °C por 2 horas. Após outro ciclo de lavagens, as placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora com conjugado anti-IgG de camundongo/peroxidase (Sigma) (1: 10000 em PBS/BSA, 50 µl por poço). Após mais um ciclo de lavagens, as reações foram reveladas pela adição de 50 µl por poço de mistura cromógena contendo 2,5 mg de OPD (o-phenilediamina dihidrocloreto – OPD) em 5 ml de tampão fosfato citrato pH 5 (citrato de sódio 0,1 M/ fosfato de sódio monobásico 0,2 M) e 2,5 µl H_2O_2. Após 15 minutos de incubação no escuro a temperatura ambiente, as reações foram interrompidas pela adição de 25 µl de H2SO4 a 30%. A absorbância das amostras foi determinada a 492 nm em leitor de microplacas (Multiskan EX – Labsystems Uniscience). Foi considerado como título de anticorpos a recíproca de diluição máxima do soro capaz de resultar em uma leitura de DO $_{492nm}$ = 0,1. A análise dos títulos foi feita utilizando-se o programa Microcal Oring 6.0.

4.4 CONJUGAÇÃO COM CORANTE COLOIDAL TÊXTIL DYSTAR©

Foram avaliados cinco corantes coloidais têxteis, gentilmente fornecidos pela Indústria Química Dystar, Ltda – São Paulo, Brasil: Dianix Azul Escuro SE-3RT, Dianix Azul Brilhante R, Dianix Azul Marinho CC, Dianix Rubi EDT 300% e Dianix Vermelho Flu G, todos em forma de pó. Antes do uso os corantes foram lavados, para obtenção da suspensão coloidal e eliminação de partículas de diferentes tamanhos, que pudessem formar precipitados e inviabilizar o processo de conjugação com o anticorpo. Além do processo de lavagem, também foram analisados diferentes parâmetros, como: determinação do peso seco residual dos corantes, determinação da absorbância máxima e padronização da concentração de cada corante a ser utilizada na conjugação com o anticorpo.

O procedimento de conjugação foi realizado de acordo com Snowden e Hommel (1991). Foram preparadas suspensões a 5% dos corantes em água (1 g/20 ml de água Mili- Q estéril). As suspensões foram lavadas quatro vezes por centrifugação a 10000 x g por 30 min, os sobrenadantes descartados e os sedimentos ressuspensos para o mesmo volume em água Mili-Q estéril seguido de centrifugado em baixa rotação (125 x g) por 30 min, para remoção das partículas coloidais agregadas. Os sobrenadantes (contendo os corantes) foram coletados cuidadosamente com micropipeta e congelados com timerosal 0.01%, a -20 °C até o uso, como suspensões estoque. Foram avaliados os espectros de absorção de cada corante, em luz visível, para determinação do pico de absorbância máxima (Aλmax).

4.4.1 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO DOS RESÍDUOS DOS CORANTES APÓS LAVAGEM

Para avaliação da quantidade de corante que era perdida no processo de lavagem, foi determinado o peso seco dos resíduos dos corantes após a última etapa de centrifugação, para se avaliar a perda durante o processo e consequentemente a viabilidade de sua utilização na conjugação com os anticorpos. Esses precipitados foram mantidos por 18 h em tubos *eppendorf* abertos, em estufa a 37 °C, para evaporação da água e o peso seco foi determinado descontando-se da concentração inicial dos corantes [50 mg/ml] o peso dos resíduos que ficaram no precipitado (ver TABELA 8 no item 5.2 Resultados e Discussão).

4.4.2 OBTENÇÃO DAS CURVAS DE ABSORBÂNCIA POR CONCENTRAÇÃO DE CADA CORANTE

As suspensões estoque dos corantes coloidais foram diluídas em água Mili-Q estéril em diferentes proporções (entre 1/10 e 1/1000), de modo que a concentração pudesse ser considerada uma função linear à absorbância. As curvas de absorbância foram determinadas por espectro de absorção em luz visível (espectrofotômetro Hitachi U-1900), para se determinar o pico de absorção ótimo (Aλmax) nos comprimentos de onda entre 400 e 700 nm.

4.4.3 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CADA CORANTE

Definidos os comprimentos de onda e o Aλmax, os corantes foram diluídos (entre 1:70 e 1:500) em água Mili-Q estéril, de modo a se obter Absorbância (Abs) = 1, no comprimento de onda adequado. As concentrações de corante a serem usadas na proporção corante/Ac foram expressas como múltiplos dessa concentração (Ex.: Abs = 5 tem 5 x a concentração de corante da suspensão com Abs = 1).

4.4.4 PREPARAÇÃO DO CONJUGADO (CORANTE/ANTICORPO DE DETECÇÃO)

De acordo com os resultados obtidos por ELISA contra os isolados humanos de *S.pneumoniae,* foram selecionados os anticorpos monoclonais anti-pneumolisina (AcM anti-Ply) D9-43, E10-24 e E24-6, para serem utilizados como anticorpos de detecção, conjugados aos corantes, ou como anticorpos de captura compondo a linha teste do *dipstick*. As Igs anti-Ply e anti-WCPW também foram avaliadas como anticorpos de detecção, conjugados aos corantes.

Para preparação do conjugado de corante têxtil com o anticorpo de detecção, três protocolos foram testados:

Protocolo 1

Foi utilizada concentração de corante Azul Brilhante R correspondentes à Abs = 5 em concentrações de anticorpos 20 µg/ml e 50 µg/ml em tampão MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidratado) 10 Mm em duas diferentes faixas de pH (6,0 e 7,0). As suspensões foram incubadas 18 h a 4 °C, sob agitação lenta, para permitir a adsorção do anticorpo ao corante. Após esse período, foi adicionado o tampão de bloqueio (NaCl 5 mM contendo BSA 30% em pH 7,4) (V/5V), 1 h a temperatura ambiente sob agitação lenta, para a estabilização da superfície das partículas. As suspensões foram centrifugadas a 10000 x g por 30 min e os precipitados ressuspensos em tampão fosfato 33,3 mM, NaCl 0,125 M, pH 7.4, contendo BSA 5% e timerosal 0.01%. Os conjugados foram estocados a -20 °C até o uso.

Protocolo 2

Foi avaliada a concentração de corante correspondente à Abs= 5, em várias concentrações de anticorpos (5 µg/ml, 20 µg/ml, 100 µg/ml e 1000 µg/ml), com tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 2,7 mM, em diferentes faixas de pH (6,0; 7,0; 7,4; 8,0). As suspensões foram mantidas em diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C e 37 °C) e tempos de incubação (1 h, 2 h e 18 h), sob agitação lenta, para permitir a adsorção do anticorpo ao corante. Após esse período, foi adicionado o tampão de bloqueio (NaCl 5 mM contendo BSA 30% em pH 7,4) (V/5V), 1h a temperatura ambiente sob agitação lenta, para a estabilização da superfície das partículas. As suspensões foram centrifugadas a 10000 x g por 30 min e os precipitados ressuspensos em tampão fosfato 33,3 mM, NaCl 0,125 M, pH 7.4, contendo BSA 5% e timerosal 0.01%. Os conjugados foram estocados a -20 °C até o uso.

Protocolo 3

Foram utilizadas diferentes concentrações de corantes (correspondentes à Abs= 5 e Abs= 10) em diferentes concentrações de anticorpos (100 µg/ml, 500 µg/ml e 1000 µg/ml). Os AcMs, ou as Igs anti-Ply ou anti-WCPV foram primeiramente diluídos para concentração final de 1 mg/ml em tampão de adsorção: 50 ml de Ácido Bórico (H_3CO_3) 0,2 M e 14,5 ml de Tetraborato de Sódio ($Na_2B_4O_7$. $10H_2O$) 0,05 M e o volume completado para 200 ml, com água Mili-Q estéril. O pH foi ajustado para 8,5 e em seguida os corantes, nas diferentes concentrações, foram adicionados a essa solução de anticorpos, na proporção de 1%. Essas soluções foram mantidas durante 16 h a 4 °C sob agitação lenta, para permitir a adsorção dos anticorpos aos corantes. Após esse período, a reação foi bloqueada com solução de BSA 10% em tampão borato 0,02 M, pH 9,0, em volume suficiente para concentração final de 1% de BSA. Após a incubação a temperatura ambiente por 1 h, a solução foi centrifugada a 15.000 x g por 25 min a 4 °C e o sobrenadante reservado para posterior avaliação dos anticorpos não conjugados, por ELISA. Os sedimentos foram ressuspensos em 2 ml de solução de BSA 2% em tampão borato 0,01 M, centrifugados a 15.000 x g por 25 min a 4 °C e finalmente ressuspensos em 1 ml de tampão de armazenamento (borato de sódio 0,01 M

contendo BSA 3%, sacarose 3% e azida sódica 0,05%, em pH 7,5) e mantidos a -20 °C até o uso.

4.4.5 AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS NÃO CONJUGADOS AO CORANTE

Para se analisar a eficiência da conjugação, alíquotas dos sobrenadantes obtidos durante o processo de lavagem e os conjugados (Corante/Anticorpo) foram avaliadas por ELISA, contra as Igs anti-Ply e anti-WCPV, em protocolo semelhante ao descrito no item 4.3.3. Para avaliação do título de anticorpos anti-Ply, as placas foram sensibilizadas com 10µg/ml de Ply e para avaliação dos anticorpos anti-WCPV, com suspensão de células da vacina pneumocócica celular (WCPV) na concentração de 2,5 x 10^7 UFC/ml.

4.5 CONJUGAÇÃO COM MICROESFERAS COLOIDAIS COLORIDAS ESTAPOR®

As microesferas coloidais Estapor, sendo um produto registrado, possuem características físico químicas estabelecidas pelo produtor, o que facilita a validação do teste. Segundo o site *Millipore on-line* as microesferas são extremamente uniformes, com tamanhos entre 200-500 nm, características que garantem uma melhor estabilização do imunocomplexo anticorpo/microesfera. As microesferas escolhidas para este trabalho (Blue A4 e Black WO) são simples, sem adição de grupos funcionais em suas superfícies, estabelecendo um acoplamento por adsorção física com o anticorpo.

As Igs anti-Ply ou anti-WCPV foram utilizadas como anticorpos de detecção, conjugadas às microesferas, na concentração final de 1 mg/ml em tampão de adsorção: 50 ml de Ácido Bórico (H_3CO_3) 0,2 M e 14,5 ml de Tetraborato de Sódio ($Na_2B_4O_7$. $10H_2O$) 0,05 M em volume completado para 200 ml, com água Mili-Q estéril. O pH foi ajustado para 8,5 e em seguida as microesferas foram diretamente adicionadas a essa solução de anticorpos, na proporção de 1%. As soluções foram mantidas por 16 h a 4 °C sob agitação lenta, para permitir a adsorção dos anticorpos às microesferas. Após esse período, a reação foi bloqueada com solução de BSA 10% em tampão borato 0,02 M, pH 9,0, acrescentada em volume suficiente para concentração final de 1% de BSA. Após a incubação a temperatura ambiente por 1 h, as soluções foram centrifugadas a 15.000 x g por 25 min a 4 °C e os

sobrenadantes reservados para posterior avaliação dos anticorpos não conjugados, por ELISA. Os sedimentos foram ressuspensos em 2 ml de solução de BSA 2% em tampão borato 0,01 M, centrifugados a 15.000 x g por 25 min a 4 °C e finalmente ressuspensos em 1 ml de tampão de armazenamento (borato de sódio 0,01 M contendo BSA 3%, sacarose 3% e azida sódica 0,05%, em pH 7,5) e mantidos a -20 °C até o uso.

4.6 CONJUGAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO COLOIDAL

As Igs anti-Ply e anti-WCPV foram conjugados a nanopartículas de ouro coloidal, segundo protocolo de Oliver (2010) e Rocha (2012).

4.6.1 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE OURO COLOIDAL

Uma suspensão de ouro coloidal a 0,01% (partículas de 20 nm de diâmetro - Sigma, St. Louis, Missouri, EUA ou BBInternational, Cardiff, Inglaterra), foi previamente ajustada para pH 9,0 com solução de carbonato de potássio 0,1 M (K_2CO_3).

4.6.2 PREPARAÇÃO DO CONJUGADO (ANTICORPO DE DETECÇÃO/OURO COLOIDAL)

Igs anti-Ply ou anti-WCPV foram diluídas em 1 ml de tampão borato de sódio 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 9,0, para concentração final de 1 mg/ml e dialisadas contra tampão borato de sódio 2 mM, NaCl 1,5 mM, pH 9,0, a temperatura ambiente, por 2 horas.

A quantidade de anticorpo necessária para estabilizar o ouro coloidal foi determinada pela adição de 10 µl de diluições seriadas (em tampão Borato 10 mM, pH 8,5) de cada anticorpo previamente dialisado, a 100 µl de ouro coloidal, previamente distribuído em microtubos, numa concentração final de anticorpos de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,15 e 1,56 µg/ml. Após 10 minutos, foram adicionados 11 µl de solução 10% de cloreto de sódio em todos os tubos. A quantidade de anticorpo suficiente para estabilizar o ouro foi a diluição em que a solução não sofreu alteração de cor, já que uma quantidade insuficiente de anticorpo alterava a coloração da solução de rosa para azul acinzentado (OLIVER, 2010) (ver item 5.4 FIGURA 16 de Resultados e Discussão).

Os anticorpos, na concentração ótima necessária para eficiência na conjugação, foram adicionados gota-a-gota a 10 ml de solução de ouro coloidal e mantidos sob agitação a temperatura ambiente por 20 minutos.

O bloqueio da reação foi feito com solução de BSA 10% em tampão borato 0,02 M, pH 9,0, acrescentada em volume suficiente para concentração final de 1%. Após a incubação a temperatura ambiente por 30 min, as soluções foram centrifugadas a 15000 x g por 25 min a 4 °C e os sobrenadantes descartados. Em seguida, os sedimentos foram ressuspensos em 2 ml de solução de BSA 2% em tampão borato 0,01 M e centrifugados a 15000 x g por 25 min a 4 °C. Os sedimentos finais (conjugados) foram ressuspensos em 1 ml de tampão de armazenamento (borato de sódio 0,01 M de BSA 3%, sacarose 3% e azida sódica 0,05%, pH 7,5) e estocados a 4 °C.

Em ensaios posteriores realizados na tentativa de diminuir a ligação inespecífica do conjugado sobre a linha teste (T) do *dispstick* controle, foram acrescidos 1% de PEG (polietilenoglicol) nos tampões de conjugação e tampões de lavagem.

4.7 LIOLIFIZAÇÃO DOS CONJUGADOS

Os anticorpos conjugados com as diferentes partículas coloidais (corante têxtil, microesferas Estapor® ou ouro coloidal) foram aplicados em volume de 500 µl sobre membrana de fibra de vidro (*Glass Fiber conjugated pad* – Millipore - 1,0 x 10 cm), liofilizados (liofilizador *Modulyod Freeze Dryer – Thermo Electron Corporation*) por 24 horas e mantidos em dessecador de vidro a vácuo a temperatura ambiente até serem utilizados nos *dipsticks*.

4.8 BLOQUEIO DA PORÇÃO DA AMOSTRA (*SAMPLE PAD*)

Para diminuir a interação não específica entre anticorpo de captura e conjugado na linha teste do *dipstick*, diferentes tampões de bloqueio foram avaliados para pré-tratamento dos filtros de celulose da Porção da Amostra (*sample pad*):

- ✓ Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Triton X-100 1%, BSA 1%;
- ✓ Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Triton X-100 0,5%, BSA 1%;

- ✓ Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Tween 20 0,5%, Caseína 1%;
- ✓ Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Tween 20 1%, BSA 1%;
- ✓ Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Tween 20 0,5%, BSA 1%;
- ✓ Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Tween 20 0,5%, Caseína 0,1%

Os filtros, nas dimensões de 2,0 X 10 cm, foram mergulhados nos tampões de bloqueio, em cubetas horizontais em temperatura ambiente e depois colocados em suporte de vidro e mantidos em estufa a 37 °C por 24 horas. Após a secagem, foram envoltos em papel alumínio e armazenados em dessecador de vidro a vácuo, a temperatura ambiente até o uso.

4.9 ESCOLHA E PADRONIZAÇÃO DA MEMBRANA DE NITROCELULOSE (MN)

Foram avaliadas MN (HIFlow Plus Millipore) com diferentes porosidades, determinadas de acordo com especificações do fabricante, baseadas na relação entre o tempo de fluxo capilar (TFC) expresso em segundos e o deslocamento do fluído em 4 cm da membrana (s/4 cm). Quanto maior o TFC, menor é a porosidade da MN. Foram testadas seis tipos de MN, representadas na TABELA 4, optando-se pela MN HF 180, que apresentou os melhores resultados.

TABELA 4: Relação entre taxa de fluxo da membrana e sua sensibilidade

Membrana	Tempo de fluxo capilar (s/4 cm)	Taxa de fluxo	Sensibilidade
HF 240	240	Mais lento	Mais sensível
HF 180	180	↓	↓
HF 135	135		
HF 120	120		
HF 090	90		
HF 075	75	Mais rápido	Menor sensibilidade

FONTE: MILLIPORE, 2008

Foram avaliadas diferentes condições de secagem da MN após a aplicação dos anticorpos de captura: em estufa a 37 °C ou a temperatura ambiente, em diferentes tempos de incubação, conforme TABELA 5. De acordo com os melhores resultados, optou-se pela secagem a 25 °C em dessecador de vidro a vácuo, por cinco dias (ver ítem 5.3.2 TABELA 11).

TABELA 5: Definição das condições de secagem da MN após deposição do AcM de captura

Temperatura	**37 °C**				**20-25 °C**				**25 °C dessecador/vácuo**				
Tempo	1h	2h	4h	16h	2h	4h	16h	48h	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias

4.10 MONTAGEM DOS *DIPSTICKS* E CORRIDA DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO

Foram aplicados na MN, os anticorpos de captura da linha teste: AcM (1,5 µl) ou Ig anti-Ply ou anti-WCPV (1 mg/ml) em PBS 0,01 M, pH 7,4, em uma área de 2,5 x 0,5 cm. Como linha controle, foi aplicada IgG de cabra anti camundongo (Sigma) (0,5 mg/ml em PBS 0,01 M, pH 7,4).

O filtro de celulose para deposição da amostra, a membrana de fibra de vidro já preparada com o conjugado (anticorpo de detecção/corante) e o filtro absorvente de celulose (Porção Absorvente) foram adequadamente fixados com fita adesiva dupla face, às extremidades da MN (onde os anticorpos de captura das linhas teste e controle haviam sido previamente aplicados), como ilustrado nas FIGURAS 3 e 4. Os *dipsticks* foram guardados em embalagens plásticas herméticas em dessecador a vácuo, a temperatura ambiente, até o uso.

Para a corrida da reação, a Porção da Amostra (*sample pad*) dos *dipsticks* foi mergulhada em tubos *eppendorf* contendo 350 µl de analitos: Ply recombinante purificada (100 µg/ml), cultivo de *S. pneumoniae* (10^3 a 10^9 CFU/ml) ou sobrenadantes de cultivo de *S. pneumoniae* (1/2 a 1/512), em meio THY ou PBS. Nos ensaios controle negativos foram utilizados como amostra meio de cultivo THY ou PBS. A reação foi avaliada por leitura visual, pelo aparecimento das linhas coloridas nos *dipsticks*, entre 8 e 10 minutos após a deposição da amostra. O teste foi considerado positivo, quando as duas linhas (teste e controle) foram visíveis, independente da variação da intensidade de cor; negativo quando somente a linha controle estava presente e inválido quando não foi evidenciada a linha controle, com ou sem a visualização da linha teste.

4.11 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

As cepas de *S.pneumoniae* foram cultivadas em meio Toddy Hewitt (THY) por 16 horas, inativadas em formaldeído (item 4.3.2) e diluídas em THY ou PBS (10^9 a 10^3 UFC/ml), para serem avaliadas nos *dipsticks*.

Em alguns ensaios, após crescimento e inativação, o cultivo foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e avaliado como amostra, no dipstick.

4.11.1 AVALIAÇÃO DE PNEUMOLISINA NATIVA EM SOBRENADANTES DE CULTIVO *DE S. PNEUMONIAE*

Para avaliação presuntiva da quantidade de pneumolisina nos sobrenadantes de cultivo de *S. pneumoniae*, um pool de soros de camundongos imunizados com Ply foi avaliado por western blotting contra diferentes concentrações da Ply recombinante homóloga (5; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 µg/ml) e contra diluições de sobrenadante de cultivo *de S. pneumoniae*. 10 µl das diferentes concentrações de Ply ou das diluições do sobrenadante foram aplicados em gel de poliacrilamida a 12% e separados por eletroforese. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e testadas contra o soro anti-Ply. As bandas foram visualizadas com o Kit ECL (GE), de acordo com as normas do fabricante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagnóstico etiológico de doenças invasivas do trato respiratório ainda representa um grande desafio, principalmente no que diz respeito à dificuldade de obtenção de material clínico ou métodos que diferenciem colonização de infecção. (RODRIGUES et al., 2002). Em países em desenvolvimento e comunidades isoladas, essas dificuldades representam um agravante, principalmente devido à falta de laboratórios equipados e profissionais da saúde devidamente capacitados, tornando-se um fator limitante sobre o controle e estudos epidemiológicos de infecções bacterianas invasivas (BERKLEY, 2005).

O método microbiológico clássico de cultivo de patógenos ainda é bastante utilizado, porém exige um tempo de pelo menos 24 h para o diagnóstico, além da falta de correlação entre culturas de vias aéreas superiores e inferiores, especialmente para os patógenos bacterianos, como *S. pneumoniae* ou *H. influenzae* (RODRIGUES et al., 2002). A hemocultura pode ser utilizada para estabelecer um diagnóstico de pneumonia pneumocócica, mas os resultados são positivos somente em um quarto dos casos (HOLMBERG; KROOK; SJOGREN, 1985) devido ao uso prévio de antibióticos, o que reduz a sensibilidade do método de identificação (MUSHER, 1992). Culturas semiquantitativas de escarro e *swab* de nasofaringe possuem sensibilidade baixa em pacientes tratados com antibióticos e muito limitada em crianças, devido à condição de portadores na nasofaringe e à não produção de escarro (BLASCHKE, 2011; WERNO;MURDOCH, 2008). Métodos diagnósticos convencionais de doença pneumocócica invasiva adquirida na comunidade são feitos através de cultura de secreções, que além da demora na obtenção dos resultados ainda falham em sensibilidade e/ou especificidade (MANDELL et al., 2007). As abordagens de diagnóstico molecular têm melhorado a sensibilidade e a especificidade de detecção, mas ainda requerem procedimentos longos de validação e equipe técnica altamente qualificada, acarretando em aumento de custos (MURPHY; BUSTIN, 2009).

A ausência de métodos rápidos, específicos e de baixo custo acarreta o desincentivo na busca do diagnóstico microbiológico para pneumonia em pacientes não internados (MANDELL et al., 2007), o que diminui a capacidade de se avaliar com precisão aspectos epidemiológicos da doença, efeitos de intervenções, tais como programas de imunização e

controle à resistência antimicrobiana e investigação de novos agentes terapêuticos (BLASCHKE, 2011).

Nesse contexto, a OMS reconhece a importância do desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos, práticos, sensíveis, específicos e de baixo custo como estratégia essencial em saúde pública e no controle de epidemias (WHO, 2000).

Os testes imunocromatográficos rápidos (*dipsticks*) são uma alternativa aos métodos tradicionais de identificação de patógenos e moléculas antigênicas, pois envolvem tecnologia rápida, sensível e relativamente simples de reação antígeno-anticorpo em uma única fase sólida, com desenvolvimento a temperatura ambiente e fácil manipulação pelo agente de saúde (WHO, 2000). A detecção rápida de *S. pneumoniae* pode ser útil para confirmar a infecção pneumocócica, facilitando a adequada orientação terapêutica (RODRIGUES et al., 2002).

Atualmente é comercializado um teste imunocromatográfico rápido, o Binax NOW® (Binax Inc., Portland, ME, USA), que detecta em amostras de urina o polissacarídeo C de parede celular, comum a todos os sorotipos de pneumococo, com resultados obtidos em 15 minutos (DOMINGUEZ et al., 2001; WERNO; MURDOCH, 2008). O método foi aprovado pelo US Food and Drug Administration (FDA) em 1999 para o uso em diagnóstico de pneumococo (DOMINGUEZ et al., 2001), tendo sensibilidade de 70% a 80% e especificidade de 90%, em comparação com método diagnóstico convencional de detecção de pneumonia pneumocócica em adultos (YU et al., 2000). A utilização do Binax NOW em diagnóstico de doenças pneumocócicas em crianças ainda tem sido questionada devido à alta taxa de resultados falso-positivos resultantes da colonização da nasofaringe com pneumococo (HAMER et al., 2002), o que acarreta diminuição da sensibilidade do teste (BLASCHKE, 2011; DOMINGUES et al., 2001; ESPOSITO et al., 2004). Um estudo em Pequim, na China, revelou que 21% das crianças do grupo controle que apresentavam colonização por pneumococo na nasofaringe tiveram testes falso-positivos nos ensaios de detecção de antígeno na urina (DOWELL et al., 2001). A mesma proporção também foi encontrada por Hamer et al. (2002) com 21,7% de falsos positivos em uma população de crianças saudáveis portadoras de pneumococo na nasofaringe. Outro estudo em Gâmbia revelou que 87% das crianças apresentaram colonização por pneumococo na nasofaringe, mas apenas 55% dos testes com Binax NOW foi positivo para presença de pneumococo (ADEGBOLA et al., 2001). Por outro

lado, a utilização do teste em crianças com ausência de colonização apresentou especificidade de 96% (HAMER et al., 2002). Com base nesses estudos, é provável que o Binax NOW deva ser usado com cautela para a detecção de pneumonia pneumocócica ou bacteremia em crianças, especialmente nos países em desenvolvimento, onde as taxas de colonização da nasofaringe são elevadas (DAVIDSON et al., 2002), mas o teste pode ser útil para o diagnóstico dessas doenças em populações com baixas taxas de colonização de nasofaringe, como em países desenvolvidos.

Alguns estudos demonstraram que a proporção de doentes com resultados positivos de hemocultura ou expectoração têm resultados negativos para o Binax NOW (MURDOCH; LAING; COOK, 2003; WERNO; MURDOCH, 2008), sendo aconselhada a utilização conjunta do teste com outros métodos de diagnóstico. Além disso, indivíduos recentemente vacinados podem desenvolver teste falso-positivo por várias semanas após a vacinação (MURDOCH; LAING; COOK, 2003).

A reatividade cruzada com diferentes espécies do gênero *Streptococcus,* principalmente os alfa-hemolíticos, tem sido relatada em alguns estudos (SORENSEN, 1987). Alonso-Tarrées (2001) relata caso de reatividade cruzada em paciente com meningite bacteriana, com resultado negativo para *S. pneumoniae* em testes convencionais e positivo por Binax NOW, mas exames bioquímicos indicaram infecção por *S. oralis*. Murdoch e Reller (2003) testaram 96 isolados de *S. pneumoniae* e 83 de estreptococos alfa-hemolíticos não pneumocócicos a partir de culturas de sangue e amostras respiratórias. Todos os isolados de *S. pneumoniae* foram positivos pelo Binax NOW, mas houve reatividade cruzada contra 20 dos isolados não pneumocócicos. Gisselsson-Solen (2007), em um estudo prospectivo de diagnóstico de otite média causada por *S.pneumoniae* com o Binax NOW, relata a ocorrência de falsos positivos e reatividade cruzada com outras espécies do gênero *Streptococcus,* principalmente *Streptococcus mitis*.

Tendo em vista essas considerações, um teste imunocromatográfico utilizando outros marcadores antigênicos, pode ser de valia na definição de um método diagnóstico rápido para *S. pneumoniae.*

O desenvolvimento de teste *dipstick* para o diagnóstico de *S. pneumoniae* considerando antígenos proteicos conservados da bactéria, seria de grande valia no diagnóstico etiológico e na avaliação da circulação da bactéria em estudos epidemiológicos.

Na escolha dos antígenos para detecção da bactéria, marcadores específicos e com baixa probabilidade de reatividade cruzada com antígenos de outras bactérias ou de outras espécies de estreptococos, poderia resultar em um teste bastante rápido, com utilidade pelo menos na triagem presuntiva da infecção, auxiliando no diagnóstico, mas também em acompanhamentos epidemiológicos.

A pneumolisina é um antígeno que pode ser bom candidato para uso em diagnóstico clínico, pois está presente em 99% dos isolados clínicos de *S. pneumoniae* (RAJALAKSHMI et al., 2002). Um possível problema seria devido à reação cruzada com estreptolisina O de *Streptococcus* do grupo A, pois ambas são citotoxinas que se ligam ao colesterol na membrana das células do hospedeiro, produzindo poros (MURRAY et al., 2009). A estreptolisina é responsável pela marca β-hemolítica vista em torno de colônias dessas bactérias, também conhecidas como *Streptococcus pyogenes,* quando cultivadas em ágar sangue (BHAKDI; TRANUM-JENSEN; SZIEGOLEIT, 1985; MURRAY et al., 2009). Entretanto, foi reportada ausência de reatividade cruzada entre anticorpos anti-pneumolisina e anti-estreptolisina, em pacientes com pneumonia pneumocócica ou com infecção por estreptococo β-hemolítico e em soros de coelhos imunizados com pneumolisina (KANCLERSKI; GRANSTROM; MOLLBY, 1987).

A pneumolisina, sendo encontrada em todas as amostras de pneumococos, com limitada variabilidade genética, pode ser uma molécula ideal como alvo diagnóstico. Vários métodos já foram utilizados na tentativa de detecção dessa proteína, como diagnóstico em diferentes espécimes clínicos, como escarro, por western blotting (WHEELER et al., 1999); urina, por aglutinação (RAJALAKSHMI et al., 2002) ou ELISA (GARCÍA-SUÁREZ et al., 2007) e em amostras respiratórias ou não, analisadas por PCR (MURDOCH et al., 2003). Nenhum desses métodos, entretanto, foi suficientemente sensível ou reprodutivo para ser incorporado à rotina clínica.

Em estudo comparativo entre o Binax Now e um ensaio imunoenzimático para detecção de pneumolisina em urina (PLY-ELISA) em adultos com infecção pneumocócica e em crianças portadoras de pneumococos na nasofaringe confirmada por cultura (GARCÍA-SUÁREZ et al., 2007), a especificidade diagnóstica para *S. pneumoniae* do teste utilizando a detecção de pneumolisina como marcador foi ao redor de 90%, enquanto que o Binax Now, que utiliza o polissacarídeo C como marcador, teve especificidade em média de até 50%.

Em nosso estudo utilizamos como anticorpos de captura, monoclonais produzidos contra uma pneumolisina recombinante (AcMs anti-Ply) e como anticorpos de detecção, conjugados às partículas coloridas, Igs anti-Ply ou contra uma vacina pneumocócica celular (WCPV), produzida à partir de cepa não capsulada de *S. pneumoniae.* Com essa abordagem, aventamos a hipótese de desenhar um dipstick capaz detectar o antígeno no analito com maior sensibilidade, facilitado por diferentes oportunidades de interação com os vários epitopos das Igs provenientes de soros policlonais, um deles dirigido contra a pneumolisina e o outro contra antígenos de pneumococos, que normalmente ficam ocluídos pela cápsula polissacarídica do *S. pneumoniae*, mas que neste caso estavam expostos, na cepa vacinal, um mutante acapsulado (GONÇALVES et al., 2013; LU et al., 2010). O imunocomplexo assim composto seria então detectado com alta especificidade pelo anticorpo monoclonal anti-Ply, fixo na fase sólida. Além disso, a utilização do soro policlonal anti-WCPV como marcador no *dipstick* poderia ampliar o nível de detecção do teste, promovendo a captura de antígenos do pneumococo no espécime clínico, tanto presentes na bactéria íntegra, quanto liberados pelos processos de lise.

Em sistemas de detecção utilizando *dipsticks*, o reagente detector corado é um dos componentes chaves para o funcionamento adequado do dispositivo (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011), razão pela qual avaliamos comparativamente três diferentes partículas coloidais coloridas, com protocolos de conjugação anticorpo/corante estabelecidos, na tentativa de obter o sistema capaz de fornecer resultados mais robustos, do ponto de vista biotecnológico, na detecção dos antígenos.

5.1 AVALIAÇÃO DA BATERIA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA OS DIFERENTES ISOLADOS DE *S.PNEUMONIAE*

Uma bateria de AcMs, anti-PspA 2 e anti-PspA 3 foi testada por ELISA (conforme item 4.3.3 de Materiais e Métodos) contra 35 isolados humanos de *S. pneumoniae* pertencentes a 17 sorotipos, de diferentes clados e famílias. Esses AcMs tiveram pouca reatividade contra os isolados clínicos de *S. pneumoniae*. Os AcM anti-PspA 3 A7-72 e J8-13 e anti-PspA 2 H5-4 e I-23, que reagiram contra um maior numero de isolados (17,1% e 14,3%, respectivamente), foram avaliados posteriormente em *dipsticks*, mas não apresentaram

reatividade contra as amostras bacterianas (dados não mostrados). Cabe ressaltar que em resultados obtidos por comunicação pessoal da Dra. Farida Nato, esses mesmos monoclonais, quando utilizados em *dipsticks* produzidos no Institut Pasteur e testados na Nigéria contra 30 suspensões de *S. pneumoniae* e 50 amostras de líquido cefalorraquidiano positivas para *S. pneumoniae*, todos os resultados foram negativos, sugerindo sensibilidade insuficiente, o que nos levou à não utilização desses anticorpos em nossos testes.

Uma série de 10 AcMs anti-Ply foi testada por ELISA (conforme descrito nos itens 4.3.3 de Materiais e Métodos) contra 84 isolados humanos pertencentes a 21 sorotipos de *S.pneumoniae*, de diferentes clados e famílias (TABELA 3 item 4.3.3 de Materiais e Métodos). Conforme resultados apresentados na TABELA 6, os AcM anti-Ply E10-24 e E24-6 reagiram contra um maior número de isolados de *S.pnemoniae* (97,6% e 67,9%, respectivamente). Entretanto, o AcM E24-6 não foi utilizado nos testes subsequentes porque não o dispúnhamos em quantidade suficiente. Deste modo, o AcM E10-24 foi selecionado para atuar como anticorpo de captura na linha teste dos *dipsticks* ou como anticorpo de detecção conjugado à partícula coloidal colorida.

TABELA 6: % de reatividade dos diferentes anticorpos monoclonais contra isolados humanos de *S.pneumoniae*

Anti-Ply	% de reatividade	Anti-PspA3	% de reatividade	Anti-PspA2	% de reatividade
H1-42	5,7	A7-72	17,1	H5-4	20,0
B19-2	11,4	G15-85	8,6	I-23	14,3
E18-7	17,1	H8-76	11,4		
F8-8	17,1	J7-6	2,9		
B7-16	19,0	J8-13	14,3		
E10-24	97,6				
E14-6	36,9				
E17-17	3,6				
E24-6	67,9				
F6-16	9,5				

Posteriormente a esses ensaios, recebemos da Dra Farida Nato o AcM anti-Ply D9-43. Esse AcM, quando avaliado por ELISA contra 20 isolados de *S.pneumoniae* de 20 diferentes sorotipos, apresentou altos títulos contra todos os isolados (TABELA 7), sendo também escolhido para atuar como anticorpo de captura na linha teste dos *dipsticks.*

TABELA 7*:* Avaliação de AcM anti-Ply D9-43 contra isolados humanos de *S.pneumoniae*.

Isolados clínicos de *S. pneumoniae*				Anti-Ply
Identificação	**Sorotipo**	**Família**	**Clado**	**D9-43 ***
P1079	1	F1	1	400
P69	10A	F1	1	400
P890	10F	F1	1	3200
P1151	11A	F1	1	3200
P630	14	F1	1	3200
P125	15B	F1	1	3200
P33	18A	F1	1	800
P770	18B	F2	4	12800
P542	18C	F1	1	12800
P947	19A	F2	3	3200
P1156	19F	F2	3	400
P1235	22F	F2	4	200
P100	23F	F2	5	6400
P10	3	F2	3	3200
P24	6A	F2	3	3200
P136	6B	F2	3	1600
P979	7C	F2	3	6400
P1163	7F	F2	3	6400
P180	9N	F2	3	3200
P146	9V	F2	3	6400

*Título de anticorpos (considerando-se leitura $DO_{492} \geq 0,1$).

5.2 *DIPSTICK* UTILIZANDO ANTICORPO DE DETECÇÃO CONJUGADO COM CORANTE COLOIDAL TÊXTIL DYSTAR©

A proposta de conjugação de anticorpos com corantes têxteis para o desenvolvimento do teste *dipstick* foi de inicio escolhida como um método alternativo para diminuir os custos e solucionar problemas de importação, pois os reagentes de detecção disponíveis no mercado atual são oriundos de tecnologias estrangeiras. Além disso, em ensaios preliminares realizados em nosso laboratório seguindo protocolo estabelecido por Snowden e Hommel (1991), foi possível estabelecer um processo de conjugação a partir de adsorção química entre corantes têxteis/anticorpos sem perda de anticorpo livre no sobrenadante de lavagem durante o processo de conjugação. Essas amostras de corantes têxteis foram fornecidas pela indústria química Rhodia, porém posteriormente não conseguimos mais contato com essa empresa para o fornecimento de mais amostras. Diante disso, procuramos novos fornecedores e a indústria química Dystar LTDA, nos forneceu

gentilmente amostras de cinco corantes têxteis de cores variadas, para serem utilizados na forma conjugada com um anticorpo como reagente de detecção do *dipstick*.

Foram avaliados os cinco corantes coloidais têxteis Dianix: Azul Escuro SE-3RT, Azul Brilhante R, Azul Marinho CC, Rubi EDT 300% e Vermelho Flu G, todos em pó. Antes do uso, os corantes foram lavados para obtenção da suspensão coloidal e eliminação de partículas de diferentes tamanhos que pudessem formar precipitados e inviabilizar o processo de conjugação com o anticorpo. Além do processo de lavagem, outros parâmetros foram analisados na padronização do processo, como: determinação do peso seco residual dos corantes, absorbância máxima de luz visível e concentração a ser utilizada na conjugação com o anticorpo.

A avaliação da quantidade de corante perdida durante o procedimento de lavagem e consequentemente a viabilidade de sua utilização na conjugação com os anticorpos, foi feita através da determinação do peso seco dos resíduos dos corantes (ítem 4.4.1 de Materiais e Métodos). De forma geral, não se observou grande quantidade de resíduos agregados em nenhum dos corantes, obtendo-se uma recuperação de aproximadamente 90% após lavagem (TABELA 8).

TABELA 8: Peso seco dos resíduos após lavagem e secagem dos corantes

	Azul escuro SE-3RT	**Azul Brilhante R**	**Rubi EDT 300%**	**Azul Marinho CC**	**Vermelho Flu G**
Peso inicial na suspensão em água (mg)	100	100	100	100	100
Peso seco do resíduo (mg)	9,8	8,5	4,0	3,2	12,6
Recuperação (mg)	90,2	91,5	96	96,8	87,4

A partir do espectro de absorção da luz visível (400-700nm) foi determinado o pico de absorção máxima (Aλmax) de cada corante, conforme mostrado na FIGURA 5: Azul Escuro SE-3RT Aλmax = 540; Azul Brilhante R Aλmax = 630; Azul Marinho CC Aλmax = 650; Rubi EDT 300% Aλmax = 580 e Vermelho Flu G Aλmax = 530.

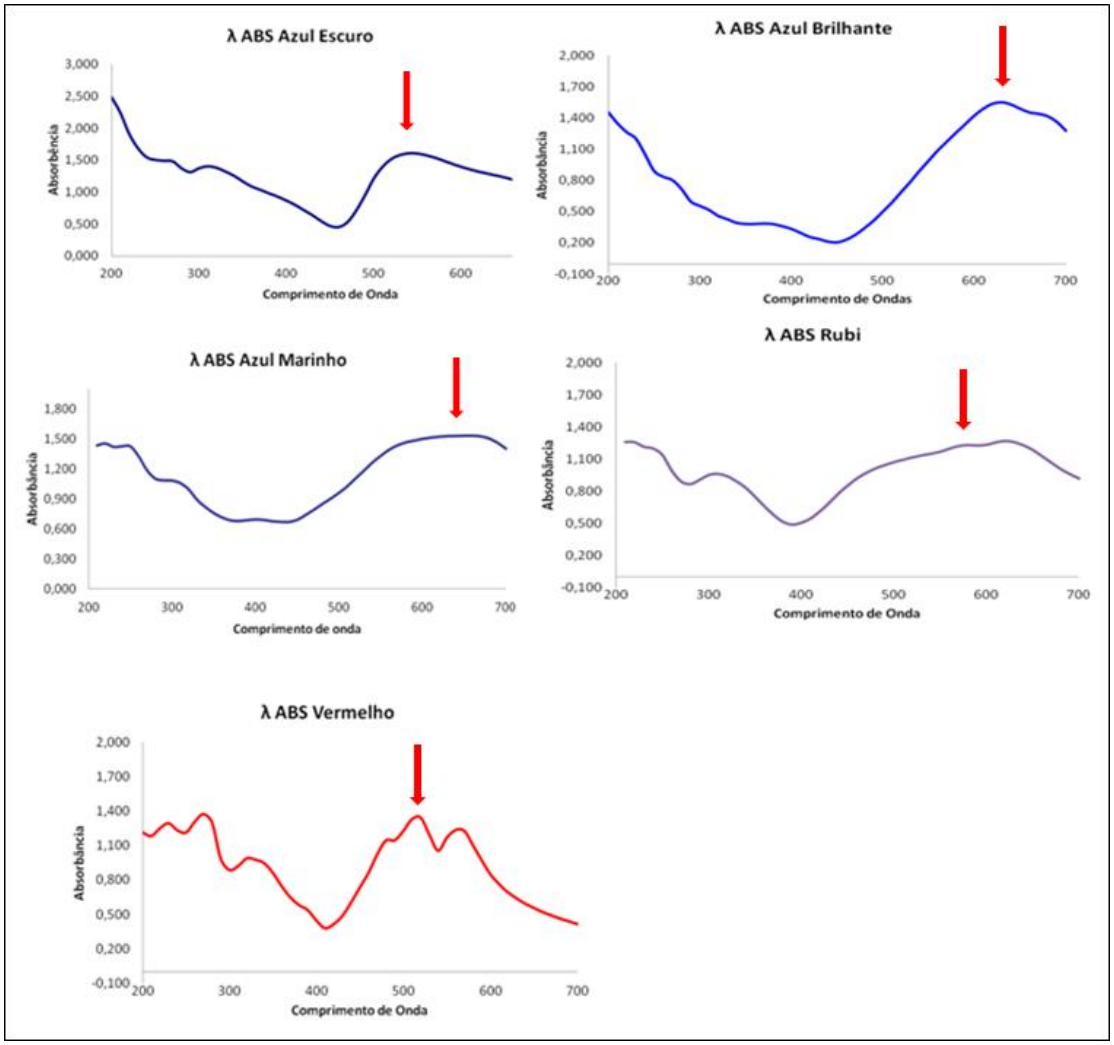

FIGURA 5: Determinação do pico de absorção da luz visível (Aλmax) dos corantes têxteis

Conhecendo-se essa variável (Aλmax), pode ser determinada a diluição de cada corante para obtenção da absorbância espectrofotométrica = 1 no comprimento de onda adequado, conforme dados mostrados na TABELA 9. Dessa forma, as concentrações de corante que foram utilizadas na proporção corante/Ac foram expressas como múltiplos de sua absorbância (Ex.: Abs = 5 tem 5 x a concentração de corante da suspensão Abs = 1).

TABELA 9: Determinação da diluição do corante em água para obter Abs = 1

Corante	Aλmax	Diluição^{-1}
Azul Escuro	1,004	360
Azul Marinho	1,027	400
Azul Brilhante	1,009	480
Rubi	1,006	400
Vermelho	1,003	330

Após a preparação da solução coloidal de cada corante têxtil, estes foram conjugados com os anticorpos, de acordo com protocolo preconizado por Snowden e Hommel (1991).

Como alguns corantes podem apresentar maior afinidade de ligação ao anticorpo do que outros (WANG et. al., 2008), os cinco corantes têxteis foram avaliados. Na escolha do mais adequado para a conjugação com o anticorpo, observamos uma sistemática precipitação dos corantes Azul Escuro SE-3RT, Azul Marinho CC, Rubi EDT e Vermelho Flu, ao serem colocados em solução com os diferentes tampões utilizados no processo de conjugação (dados não mostrados). Essa precipitação ocasionava a perda da intensidade de cor nas linhas teste e controle dos *dipsticks* e consequentemente dificuldade para interpretação visual do resultado. O corante Azul Brilhante R foi uma exceção a este problema e por proporcionar uma intensidade de coloração mais adequada foi selecionado para as próximas etapas de padronização.

Vários fatores podem influenciar na padronização das condições ideais de conjugação e máxima intensidade da cor na linha teste do *dipstick*, dentre eles a concentração do corante a partir da absorbância máxima (Aλmax), tampão de conjugação, tempo de incubação anticorpo/corante, temperatura e pH. Segundo Gribnau (1983, 1986), o pH exerce condição crítica na ligação do anticorpo com o corante, e cada complexo corante/anticorpo é particularmente influenciado pelo pH (WANG et al., 2008). Acredita-se que o pH ótimo para a adsorção de uma proteína está próximo ao do seu ponto isoelétrico (PI) (NORDE, 1986). O PI de um anticorpo policlonal varia em torno de oito, ao passo que para os anticorpos monoclonais o PI varia com o isotipo, sendo que os fragmentos Fab e Fc de Igs adsorvem de forma diferente em diferentes valores de pH (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011; GEOGHEGAN, 1988; KAWAGUCHI et al., 1989).

Dessa forma, avaliamos diferentes condições de conjugação, considerando a absorbância do corante Azul Brilhante R na diluição adequada, a concentração dos anticorpos, o pH, a temperatura e o tempo de incubação (TABELA 10). Por essa tabela, observamos que os tampões fosfato de sódio 10 mM, NaCl 2,7 mM, pH 7,4 e borato 20 mM, pH 8,5 aliados a outras condições como: corante com Abs = 5, concentração do anticorpo de 1 mg/ml, temperatura de incubação de 4 °C, 18 h sob agitação levaram a maior eficiência na ligação do complexo anticorpo/corante.

TABELA 10: Condições de conjugação anticorpo/corante têxtil

[A] Condição	[B] AΛmax do Corante	Anticorpo [Concentrações avaliadas - µg/ml]	Tampão de conjugação	pH	Temperatura de incubação	Tempo de incubação	[F] Conjugado X Ply	[G] Sobrenadante X Ply
1	5	E10- 24 [5]	[C] Fosfato 10 mM	7,4	25°C	1 h; 2 h	0,019	0,179
2		E10-24 [20; 5]					0,023	0,110
3		D9-43 [100]		6,0; 7,0; 7,4; 8,0	25°C; 37°C; 4 °C	2 h; 18 h	0,302	0,410
4		Anti-WCPV e Anti-Ply [1000]		7,4	37°C; 4 °C; 4 °C	18 h	0,740	0,738
5				7,4	4 °C	18 h	0,887	0,835
6		E10-24 [20]	[D] MES 10 mM	6,0; 7,0	4 °C	18 h	0,096	0,393
7		E10-24 [50]					0,112	0,405
8		Anti-WCPV e Anti-Ply [1000]	[E] Borato	8,5	4 °C	18 h	0,832	0,835

[A] A condição 1 foi avaliada com o corante Vermelho Flu e as demais com o Azul Brilhante R

[B] AΛmax do Corante – foram avaliadas as AΛmax 3, 5 e 10. Como os resultados foram semelhantes, passamops a utilizar a AΛmax 5.

[C] Fosfato: Na2HPO4 10 mM + NaCl 2,7 mM, pH, 7,4.

[D] MES: $C_6H_{13}NO_4S$ * H_2O (Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidratado) 10 Mm;

[E] Borato: H_3CO_3 50 mM + $Na_2B_4O_7$. $10H_2O$ 36,2 mM, pH, 8,5;

[F] ELISA: Conjugados avaliados contra Ply; média dos resultados de leitura a DO_{492nm} nas diferentes condições;

[G] ELISA: sobrenadantes obtidos durante as etapas de lavagem do ensaio de conjugação avaliadas contra Ply.

Definidos os protocolos de conjugação, fizemos a montagem dos *dipsticks* e os testes com os analitos. O corante Azul Brilhante R foi conjugado com Ig anti-WCPV [1 mg/ml] constituindo o complexo de detecção do dispositivo. O AcM D9-43 [0,5 mg/ml] foi utilizado com anticorpo de captura, imobilizado na linha teste da MN. A porção da amostra do *dipstick* foi mergulhada em 350 µl de suspensão de *S. pneumoniae* em tampão PBS a uma concentração de 10^8 UFC/ml. O *dipstick* controle foi testado somente em PBS como amostra. Após 10 minutos, observamos intensa coloração inespecífica, que se depositava na linha teste do *dipstick* controle (FIGURA 6 – 1b), ocasionando um falto-positivo e invalidando o ensaio.

Na tentativa de diminuir a inespecificidade da reação, fizemos tentativas de bloqueio da MN, seguindo protocolos preconizados por Jiang (2011) e Nataraju (1993). Após a aplicação do anticorpo de captura nas linhas teste e controle, a MN foi pré-tratada com BSA em diferentes concentrações (2%, 1% e 0,1% em tampão PBS, pH 7,4). Após secagem da membrana, os *dipsticks* foram montados e testados em suspensão de *S.pneumoniae* em PBS (FIGURA 6 - 2; 3; 4). Por essa figura pode-se notar que apesar de ter havido diminuição da

coloração de fundo, houve também perda da intensidade da cor, prejudicando a visualização do teste, principalmente nos dipsticks com MN tratada com maior concentração de BSA (FIGURA 6 - 2, a; b). Para os *dipsticks* onde a MN foi tratada com BSA 1% e 0,1% (FIGURA 6 - 3 e 4, respectivamente) as reações foram consideradas válidas, mas de baixa intensidade. Além disso, também se observou redução da taxa de fluxo dos reagentes na MN, principalmente com as maiores concentrações de BSA, aumentando o tempo para visualização dos resultados.

O bloqueio da MN com proteínas ou polímeros sintéticos, apesar de reduzir a ligação inespecífica do complexo detector ao anticorpo de captura, pode ocasionar a redução da taxa de fluxo da amostra devido à oclusão dos poros ao longo da membrana (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011; WONG; TSE, 2009).

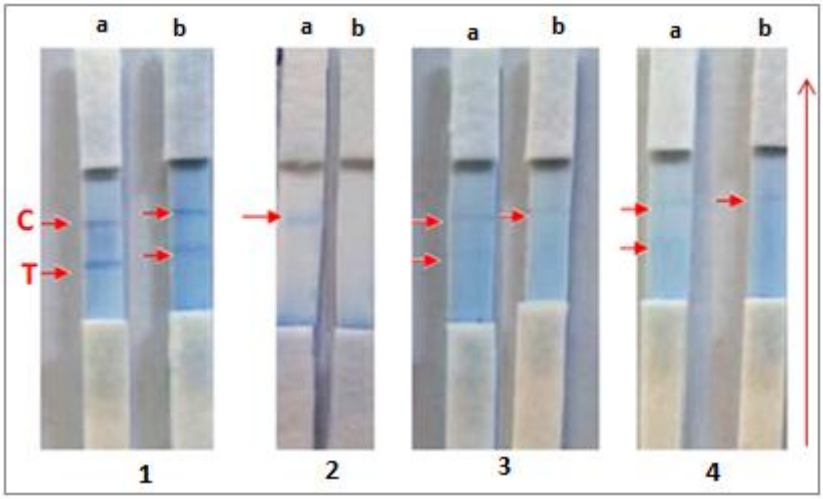

FIGURA 6: *Dispsticks* confeccionados com corante têxtil Azul Brilhante R. Conjugado: Anti-WCPV [1 mg/ml]/Azul Brilhante R; Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 [1 mg/ml]; Ac de Captura linha controle (C): IgG anti-mouse [1 mg/ml]. Temperatura de incubação: 25 °C; Tempo de corrida: 10 min; MN: HF 180; **a)** Amostra: Suspensão de *S.pneumoniae* em PBS; **b)** Amostra: PBS. **1)** MN não tratada; **2)** MN Tratada com PBS/BSA 2%; **3)** MN Tratada com PBS/BSA 1%; **4)** MN Tratada com PBS/BSA 0,1%.

Em estudos preliminares utilizando corantes fornecidos pela indústria química Rhodia, foi possível se encontrar uma proporção ótima corante/anticorpo, sem perda de anticorpo livre no sobrenadante de lavagem durante o processo de conjugação. Entretanto os corantes têxteis disponíveis neste estudo provavelmente possuem maior fragilidade e/ou

uma estrutura química que dificulta sua adsorção ao anticorpo, o que provavelmente ocasionou a alta concentração de anticorpos livres no sobrenadante das etapas de lavagem. Escolhemos os conjugados contendo maiores títulos por ELISA na forma conjugada e a correspondente melhor concentração do corante para a confecção dos *dipsticks*. Entretanto, para obtermos sensibilidade suficiente para uma boa visualização das linhas teste dos *dipsticks* nas conjugações com os corantes têxteis, a concentração requerida de anticorpos é bastante alta, da ordem de 1 mg/ml. Para nossa surpresa, essa mesma concentração de anticorpos foi a mais adequada quando utilizamos as microesferas Estapor (item 5.3). Por outro lado, nas conjugações com o ouro coloidal (item 5.4) a concentração de anticorpos utilizada na conjugação foi muito menor, variando de 25-50 µg/ml (FIGURA 16).

Em nosso estudo, o corante têxtil apresentou algumas limitações ocorridas durante a padronização do protocolo de conjugação com o anticorpo de detecção como: (i) baixa eficiência no processo de conjugação com o anticorpo, (ii) alta concentração de anticorpo utilizada no processo, limitações também relatadas por Rocha (2012) e (iii) alta coloração inespecífica de fundo no *dipstick* controle negativo, decidimos descontinuar essa abordagem, porém vale ressaltar que o estudo utilizando corantes têxteis como reagente de detecção contribuiu de maneira significativa na compreensão de vários parâmetros técnicos e na padronização de diversas variáveis como: escolha dos tampões, influência do pH nas soluções, definição do tempo e da temperatura de adsorção da partícula ao anticorpo, tipos e locais de bloqueio e escolha da MN. Os resultados obtidos com a padronização desses parâmetros contribuíram para um melhor embasamento teórico e prático na confecção dos testes *dipsticks* utilizando as outras partículas coloidais coloridas também testadas neste trabalho. Entretanto, não se descarta a possibilidade de se utilizar corantes têxteis de outra procedência, que podem variar suas características químicas e físicas de adsorção ao anticorpo conjugado. Em qualquer das possibilidades, deve ser feito um estudo acurado de custo, quando se pensa em produção em larga escala.

5.3 *DIPSTICK* UTILIZANDO ANTICORPO DE DETECÇÃO CONJUGADO A MICROESFERAS COLOIDAIS COLORIDAS ESTAPOR®

As microesferas Estapor, desenvolvidas para biodetecção em imunoensaios, são adquiridas em solução coloidal com partículas de tamanho uniforme em torno de 200 nm e com características físicas e electroquímicas bem definidas pelo fabricante (MERCK, 2012). Ao contrário do corante têxtil, não necessita de pré-tratamento na preparação da solução coloidal, o que torna o processo de conjugação mais simples. Assim como com o corante têxtil, as microesferas também foram conjugadas com anticorpos por simples adsorção, seguindo-se os protocolos de conjugação estabelecidos com o corante têxtil, com algumas modificações.

Na etapa inicial avaliamos algumas condições de conjugação que favorecessem o acoplamento entre microesfera e anticorpo. Para isso, consideramos as condições já estabelecidas no processo de conjugação do corante têxtil, tais como: tampões de conjugação, pH das soluções, tempo e temperatura de incubação do corante/anticorpo, condições de bloqueio da MN e amostra e concentração do anticorpo.

Optamos por avaliar os dois tampões com os melhores resultados no acoplamento com o corante Brilhant Blue R (TABELA 10): o tampão fosfato de sódio 10 mM NaCl 0,15 mM, pH 7,4 e o tampão borato 10 mM, pH 8,5. Foram confeccionados *dipsticks* utilizando conjugados anti-Ply/microesfera Estapor e o AcM D9-43 como anticorpo de captura (FIGURA 7). Podemos supor que o tampão borato tenha sido mais eficiente no acoplamento anticorpo/microesfera, já que os *dipsticks* com tampão fostato durante os ensaios de reprodutibilidade apresentaram coloração inespecífica, com deposição de reagentes e coloração na linha teste (T) do *dipstick* controle (FIGURA 7 A3) e coloração tênue nas linhas controle da reação (C) (FIGURA 7 A1, 2, 3), enquanto que com o tampão borato o teste foi válido, sem reatividade inespecífica, tanto para a reação com células de *S. pneumoniae* (FIGURA 7 B1), quanto com antígenos de *S. pneumoniae* presentes em sobrenadantes de cultivo (FIGURA 7 B2). Por este e em outros experimentos, as microesferas Estapor Blue A4 ou Black WO se mostraram igualmente eficientes, tanto na conjugação com os anticorpos de detecção quanto na nitidez das linhas teste e controle. A maior eficiência da conjugação com o tampão borato pode ser devida a uma ligeira qualidade tensoativa, que auxilia na

solubilização das partículas conjugadas quando entram em contato com o analito na porção da amostra (MILLIPORE, 2008). Durante o processo de conjugação o pH do tampão de conjugação deve ser igual ou ligeiramente mais básico do que o PI da proteína, pois teoricamente expõe grupos hidrofóbicos para uma adsorção mais eficiente (WONG; TSE, 2009). O tampão borato, a um pH em torno de 8,5 favorece a conjugação com Igs derivadas de soros policlonais, que segundo Kawaguchi (1989) têm um PI que varia em torno de oito.

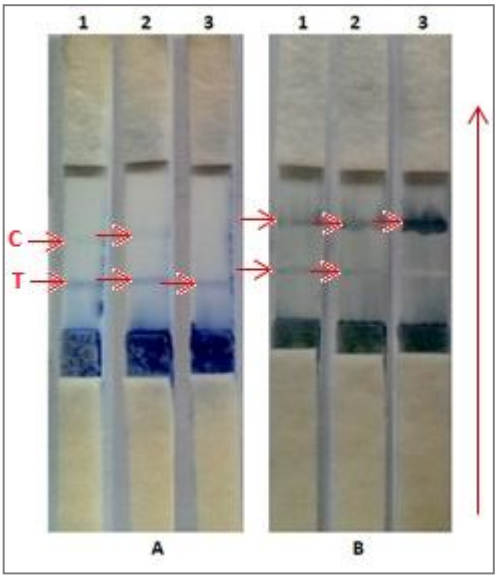

FIGURA 7: Avaliação de diferentes tampões de conjugação anticorpo/microesfera Estapor. Conjugado: Anti-Ply [1 mg/ml]/microesfera Estapor Blue A4 (A) e Black WO (B); Ac de Captura (linha teste - T): AcM D9-43 [1 mg/ml]; Ac de Captura (Linha controle - C): IgG de camundongo [0,5 mg/ml] **1)** Cultivo de *S. pneumoniae* [10^9 UFC/ml] em THY; **2)** Sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae*; **3)** THY. **A** Tampão de conjugação: fosfato 10 mM NaCl 0,15 mM, pH 7,4**; B)** Tampão de conjugação: borato 10 mM, pH 8,5. Temperatura de incubação: 25 °C; Tempo de corrida: 15 min; MN HF 180

5.3.1 MONOCLONAIS E POLICLONAIS COMO ANTICORPOS DE CAPTURA OU COMO CONJUGADOS NOS *DIPSTICKS*

Esquemas adequados de indução da resposta imune humoral tendem a gerar anticorpos policlonais com alta afinidade por múltiplos epitopos do antígeno. Quando utilizados em imunoensaios, esses anticorpos podem responder pela alta sensibilidade do teste. Já os AcMs, oriundos de clones celulares que reconhecem epitopos específicos do

antígeno, podem conferir maior especificidade a um imunoensaio. Dessa forma, a combinação de anticorpo policlonal e monoclonal em um imunoensaio podem aumentar sua sensibilidade e especificidade (ANDREOTTI et at., 2003; NGOM et al., 2010).

Em nossos ensaios, os AcMs D9-43 e E10-24 e as Igs provenientes de soro policlonal anti-Ply e anti- WCPV foram testados em diferentes combinações na confecção dos *dipsticks*, variando a sua participação no ensaio tanto como anticorpos de captura, quanto como anticorpos de detecção, na forma conjugada, acoplados aos diferentes corantes. A melhor visualização das linhas teste foi obtida quando foram feitas combinações utilizando os policlonais anti-Ply e anti-WCPV como anticorpos de detecção, conjugados às partículas coloridas, e como anticorpos de captura os anticorpos monoclonais, principalmente o AcM D9-43. A maioria dos resultados apresentados é proveniente de experimentos usando essas construções de *dipsticks*. Ressaltamos que em alguns casos, as diferenças na tonalidade das linhas de reação são basicamente de acurácia visual, sendo difícil a sua expressão em figuras fotográficas, razão pela qual nos omitimos de apresentar figuras expressando esses nuances de coloração.

5.3.2 DEFINIÇÃO DA TEMPERATURA DE SECAGEM E ARMAZENAMENTO DA MN

É amplamente reconhecido que as condições de secagem adequadas da membrana de nitrocelulose, após a aplicação do anticorpo de captura nas linhas teste e controle, é uma etapa importante para assegurar a estabilidade da ligação do anticorpo (JONES, 1999), embora esse procedimento varie consideravelmente entre os autores (MARTÍNEZ-SERNANDEZ et al., 2011). Dessa forma, em nosso trabalho foram avaliadas empiricamente algumas condições de secagem da MN após a deposição do anticorpo de captura na linha teste e controle (TABELA 11): (i) a 37 °C; (ii) a temperatura ambiente (20-25 °C); (iii) a temperatura ambiente, em dessecador de vidro a vácuo. A secagem a 37 °C ocasionou a deposição inespecífica dos reagentes, independentemente do tempo de secagem (TABELA 11) com formação inespecífica da linha teste (T) no *dispstick* controle e levando a resultado falso-positivo (FIGURA 8 – 1b). A secagem à temperatura ambiente (20-25 °C) foi avaliada após 2, 4, 16 e 48 hs, com resultados satisfatórios nos *dipsticks* controle nos tempos de secagem maiores do que 4 horas (TABELA 11; FIGURA 8 - 2; 3). No entanto, verificamos que

conforme havia um aumento na umidade relativa do ar, os *dipsticks* secos e armazenados em temperatura ambiente perdiam a especificidade. A umidade relativa do ar também é um fator que exerce um efeito significativo no funcionamento adequado do *dipstick,* tanto no momento em que é aplicado o anticorpo sobre a linha de captura (JONES, 1999; YAN et al., 2006), como em condições secas de armazenagem, sendo fundamental para produzir adsorção máxima dos reagentes de captura (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011).

MNs expostas a condições de alta umidade podem comprometer o desempenho do teste, resultando em baixo fluxo capilar ou sua ausência (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011; WONG; TSE, 2009). Dessa forma, fizemos a secagem da MN em dessecador de vidro a vácuo durante cinco dias, para avaliar o grau de deposição inespecífica de conjugado na linha teste. Constatamos que a secagem da MN a partir do quarto dia em dessecador determinou a ausência de deposição inespecífica dos reagentes na linha teste do *dipstick* controle negativo (TABELA 11).

TABELA 11: Definição das condições de secagem da MN após deposição do AcM de captura

Temperatura	**37 °C**				**20-25 °C**				**20-25 °C dessecador/vácuo**				
Tempo	1 h	2 h	4 h	16 h	2 h	4 h	16 h	48 h	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias
	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	++	+	+	-	-

+ Intensidade de deposição inespecífica dos reagentes no *dipstick* controle

- Ausência de deposição inespecífica dos reagentes no *dipstick* controle

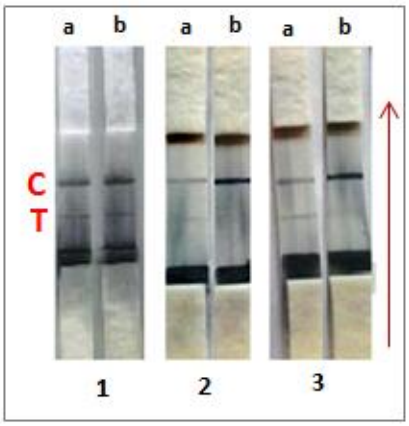

FIGURA 8: **Temperatura de incubação da MN após aplicação dos anticorpos de captura.** *Dipsticks* confeccionados com microesferas Estapor Black WO. Conjugado: anti-Ply [1 mg/ml]/Microesferas Estapor; Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 [1 mg/ml]; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse [0,5 mg/ml]. **1)** 37 °C, 1 h; **2)** 4 h a temperatura ambiente; **3)** 48 h a temperatura ambiente. **a**) Dipsticks teste: amostra Cultivo de *S. pneumoniae* 10^8 CFU/ml. **b**) Dipsticks controle: amostra THY. Tempo de corrida: 15 min; MN: HF 180

Este ensaio foi importante para o futuro desenvolvimento de procedimentos operacionais padrão (POPs) no protocolo de confecção dos *dipsticks*, uma vez que nos possibilitou a informação de que a MN seca e mantida em dessecador a vácuo a temperatura ambiente permite testes mais fidedignos no desenvolvimento da reação. É importante ressaltar que os ensaios que objetivaram a padronização das condições para melhorar a sensibilidade e especificidade dos *dipsticks,* utilizando conjugados com microesferas Estapor ou ouro coloidal, ocorreram em paralelo. A escolha dos anticorpos de captura e de detecção e a determinação das condições de secagem e armazenagem da MN foram efetuadas com as microesferas Estapor, enquanto que os ensaios para a escolha do tampão de bloqueio na porção da amostra (item 5.4.1) e escolha da MN (item 5.4.2) foram feitos com conjugado utilizando ouro coloidal. Dessa forma, os ensaios qualitativos, quantitativos e de estabilidade foram conduzidos com protocolos padronizados com ambos os conjugados.

5.3.3 *DIPSTICK* CONFECCIONADO COM ANTI-WCPV CONJUGADO A MICROESFERAS ESTAPOR: DETECÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE *S. PNEUMONIAE* E PNEUMOLISINA

Para análise qualitativa na detecção de *S. pneumoniae*, foram produzidos *dispsticks* com MN HF180 utilizando como partícula reveladora corada microesferas Estapor Black WO conjugadas a 1 mg/ml de anti-WCPV e como anticorpo de captura o AcM D9-43.

Um primeiro ensaio foi conduzido utilizando-se como amostras: cultivo de 16 horas de *S.pneumoniae* (amostra P741 sorotipo 6B) em concentração de 10^8 UFC/ml ou Ply recombinante na concentração de 100 µg/ml, em THY. No teste controle foi utilizado somente THY como amostra. O resultado deste ensaio (FIGURA 8) demonstra que o *dipstick* reconheceu a bactéria em meio de cultivo (10^8 UFC/ml) (FIGURA 9 - 1), mas não a Ply recombinante (FIGURA 9 - 2).

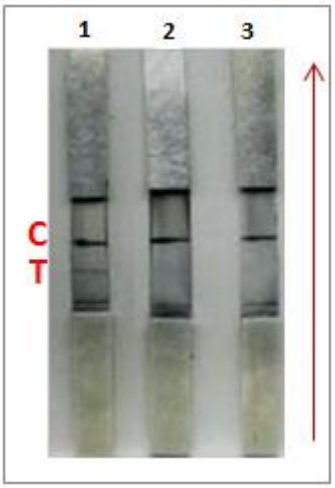

FIGURA 9: **Detecção de *S. pneumoniae* ou de pneumolisina por anti-WCPV conjugado a microesferas Estapor.** Conjugado: anti-WCPV/microesfera Black WO; Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml; **1)** Amostra: cultivo de *S. pneumoniae* 10^8 UFC/ml; **2)** Amostra: Ply [100 µg/ml] em THY; **3)** THY. Temperatura de incubação: 25 °C; Tempo de corrida: 15 min; MN HF 180

A mesma análise foi conduzida com isolados clínicos *S. pneumoniae* de oito diferentes sorotipos (6A, 6B, 18A, 14, 19A, 23F, 9V e 19F) (FIGURAS 10 e 11), escolhidos dentre os mais frequentemente associados a: perfis de multirresistência em doenças pneumocócicas (MCGEE, L., et al., 2001); sorotipos prevalentes em infecções invasivas em países da América Latina (KERTESZ, et. al., 1998) e os prevalentes em estudo prospectivo de vigilância com isolados clínicos de crianças com infecções invasivas pneumocócicas realizado em três cidades brasileiras (BRANDILEONE et al., 1998). Nesses ensaios, *dipstick*s utilizando anticorpo de detecção anti-WCPV [1 mg/ml] ou anti-Ply, conjugados com microesferas Estapor e anticorpo de captura D9-43 [1 mg/ml] (FIGURA 10A e 10B, respectivamente), foram capazes de detectar *S.pneumoniae* (10^8 UFC/ml) em meio de cultivo, em todos os sorotipos avaliados. Esses mesmos sorotipos de *S. pneumoniae*, excluindo-se o 9V, também foram detectados em cultivo (10^8 UFC/ml), quando se utilizou anticorpo de captura E10-24 [1 mg/ml] com anticorpo de detecção anti-WCPV [1 mg/ml] (FIGURA 11).

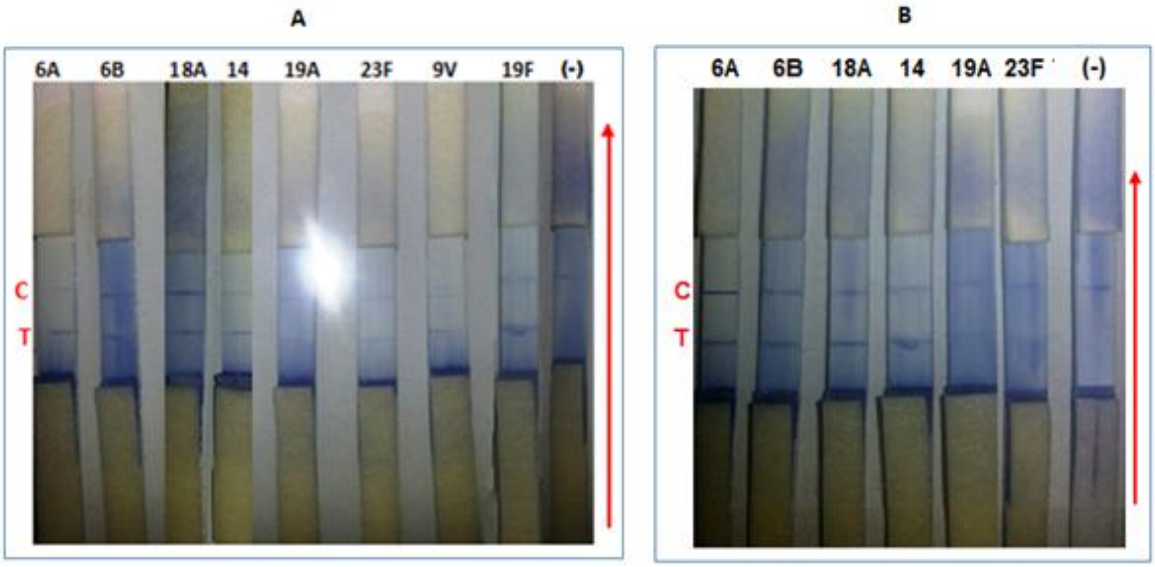

FIGURA 10: **Detecção qualitativa de diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* por *dipstick:* (A) Conjugado anti-WCPV/ Microesfera Estapor Blue A4**. **(B) Conjugado anti-Ply/ Microesfera Estapor Blue A4**. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml. Amostra: Cultivo em THY de *S. pneumoniae:* 10^8 UFC/ml. (-) *Dipstick* controle negativo - amostra: THY. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 15 min; MN HF 180.

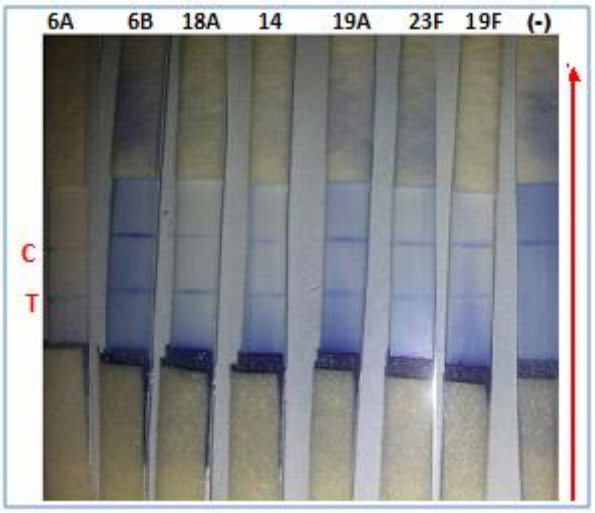

FIGURA 11: **Detecção qualitativa de diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* por *dipstick:* conjugado anti-WCPV/ Microesfera Estapor Blue A4**. Ac de captura linha teste (T): AcM E10-24 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml. Amostra: Cultivo em THY de *S. pneumoniae:* 10^8 UFC/ml. (-) *Dipstick* controle negativo - amostra: THY. Temperatura de incubação: 28 ° C; Tempo de corrida: 15 min; MN HF 180.

Ainda com a mesma construção, *dipsticks* foram utilisados na análise quantitativa de sensibilidade, em cultivo de 16 horas de *S.pneumoniae* (isolado P741 sorotipo 6B) (FIGURA 12). O resultado demonstrou, para essas condições, um limite de detecção da bactéria em caldo THY de 10^4 UFC/ml.

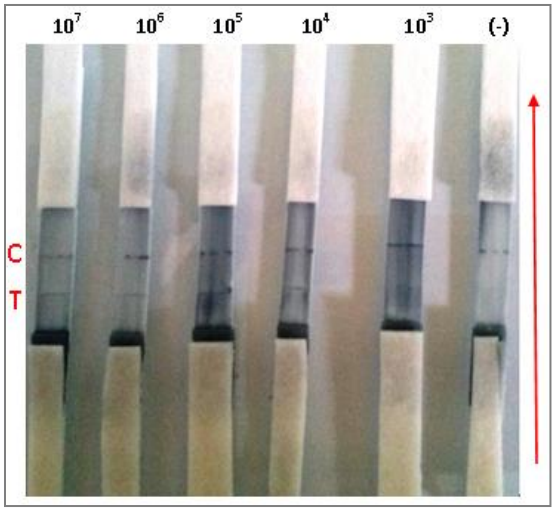

FIGURA 12: **Limite de detecção de *S. pneumoniae* por *dipstick* com conjugado anti-WCPV/microesfera Estapor Black WO**. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 1 mg/ml. Amostra: cultivo de *S. pneumoniae:* 10^7, 10^6, 10^5, 10^4 e 10^3 UFC/ml em THY). (-) *Dipstick* controle negativo - amostra: THY; Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 15 min; MN HF 180.

Essa mesma construção de *dipstick* foi também utilizada na detecção de pneumolisina em sua forma nativa, em sobrenadante de cultura de *S. pneumoniae*, já que em ensaio anterior (FIGURA 9 - 2), observamos que o dispositivo não foi capaz de detectar a proteína Ply recombinante. Como amostra, foi avaliado o sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae* obtido após centrifugação a 10000 rpm por 10 min a 4 °C, de cultivo com aproximadamente 10^8 UFC/ml. O sobrenadante foi coletado e submetido à diluição seriada em THY, de 1:1 a 1:64. Sabe-se que a pneumolisina não é secretada durante o crescimento do pneumococo, mas está intimamente associada à autolisina (LytA), que degrada a parede celular durante a fase de mitose ou perturbação celular, liberando a pneumolisina para o meio extracelular (RUBINS; JANOFF, 1998). Dessa forma, estabelecemos um ensaio quantitativo para detecção de pneumolisina nos sobrenadantes de cultivo, liberada por

autólise de células. Na FIGURA 13 pode ser observado que o *dipstick* foi capaz de detectar a pneumolisina nativa até a diluição de 1/16 do sobrenadante de cultura do *S. pneumoniae*.

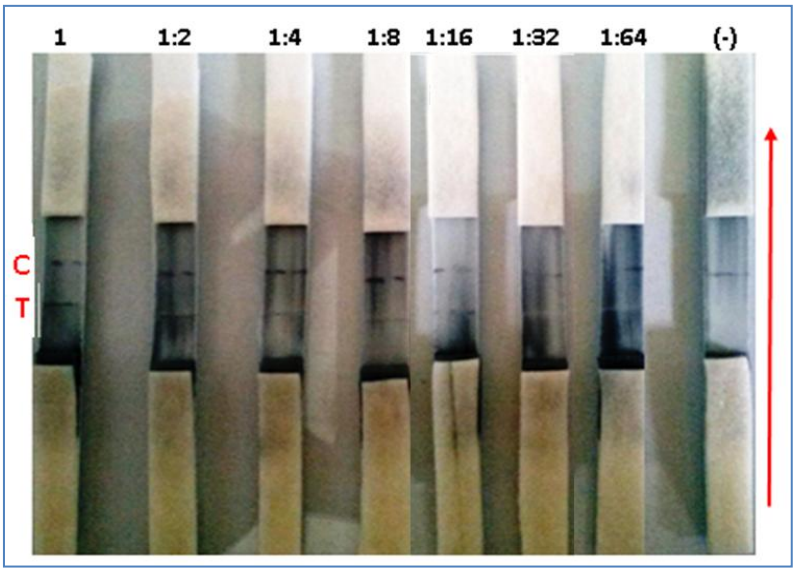

FIGURA 13: Limite de detecção de pneumolisina nativa por *dipstick* com conjugado anti-WCPV/microesfera Estapor Black WO. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml. Amostra: Sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae,* em diluição seriada em THY, de 1:1 a 1:64. (-) *Dipstick* controle negativom - amostra: THY. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 15 min; MN HF 180.

Para uma análise estimativa da concentração de pneumolisina no sobrenadante de cultivo, realizamos uma reação de western blotting desse sobrenadante contra o soro de camundongo anti-Ply, com uma curva padrão de Ply recombinante contra esse mesmo soro. Diversas concentrações de Ply (5 µg/ml; 2,5 µg/ml; 1,25 µg/ml; 0,62 µg/ml e 0,31 µg/ml) e diluições do sobrenadante do cultivo (1:2; 1:4; 1:8; 1:16) foram submetidas a separação eletroforética por SDS-PAGE (FIGURA 14A) e a seguir transferidas para membrana de nitrocelulose e testadas contra o soro anti-Ply (FIGURA 14B). Embora não tenha sido possível a visualização das bandas de Ply no SDS-PAGE do sobrenadante, as bandas foram nitidamente visualizadas após reação de western blotting contra o soro anti-Ply, em todas as diluições avaliadas. Considerando que: (i) pela curva padrão de Ply no western blotting foi visualizada banda de forte intensidade na concentração de Ply = 310 ng/ml; (ii) a intensidade das bandas nas diluições do sobrenadante são bem mais tênues, denotando concentração

de pneumolisina no gel bem menor do que a menor concentração de Ply avaliada na curva padrão; (iii) o *dipstick* foi capaz de detectar pneumolisina até a diluição de 1/16 do sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae*, podemos inferir que o nível de detecção de pneumolisina nativa pelo *dipstick* seja ≤ 19.3 ng/ml, dividindo-se a menor concentração de Ply avaliada na curva padrão (310 ng/ml) pela maior diluição avaliada do sobrenadante (1/16).

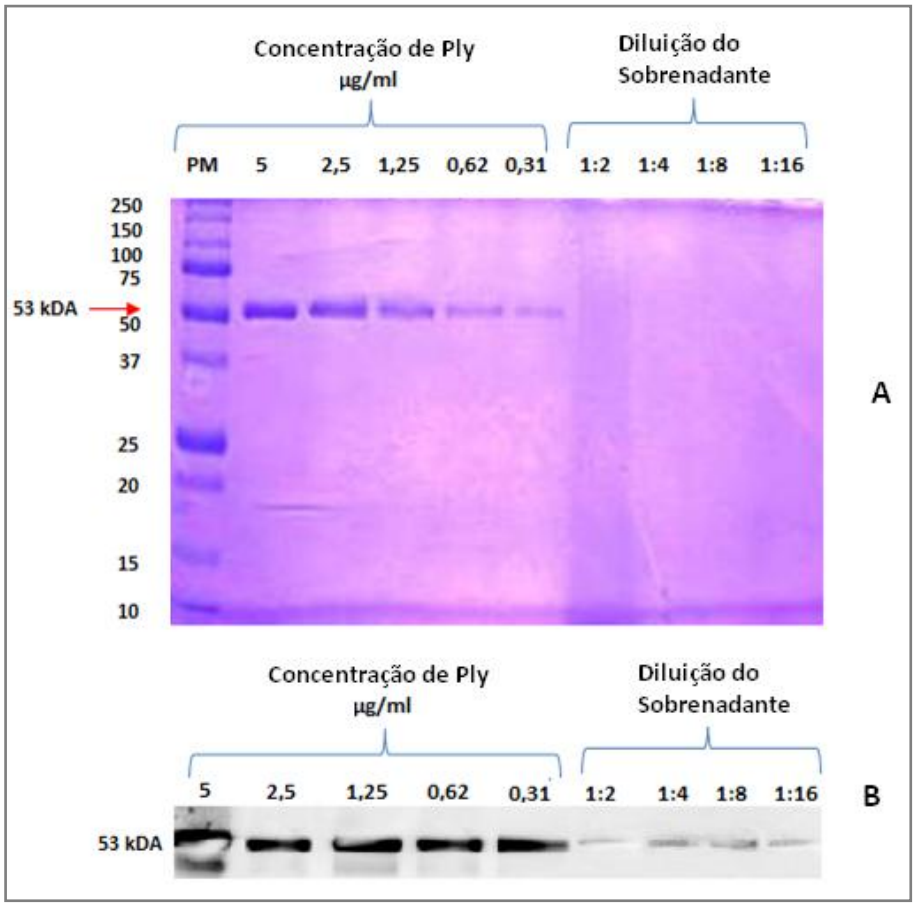

FIGURA 14: SDS-PAGE em gel de acrilamida 12% e Western Blotting de Ply e sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae* contra soro anti-Ply. Padrão de massa molecular 250-10 kDa (Bio-Rad). **A)** SDS-PAGE com diferentes concentrações de Ply (5; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 µg/ml) e diluição seriada do sobrenadante de cultivo de *S.pneumoniae* (1:2; 1:4; 1:8; 1:16). **B)** Western blotting da Ply recombinante e do sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae* contra soro anti-Ply.

5.3.4 *DIPSTICK* CONFECCIONADO COM ANTI-PLY CONJUGADO A MICROESFERAS ESTAPOR: LIMITE DE DETECÇÃO DE PNEUMOLISINA

Foram produzidos *dispsticks*, utilizando como partícula reveladora colorida microesferas Estapor Black WO conjugadas a 1 mg/ml de anti-Ply e como anticorpo de captura o AcM D9-43. Como nos experimentos descritos no item anterior, foi avaliada como amostra alíquota de sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae,* em diluição seriada em THY (1:1 a 1:516). O *dipstick* foi capaz de detectar a pneumolisina nativa no sobrenadante de cultura do *S. pneumoniae*, até a diluição 1/32 (FIGURA 15).

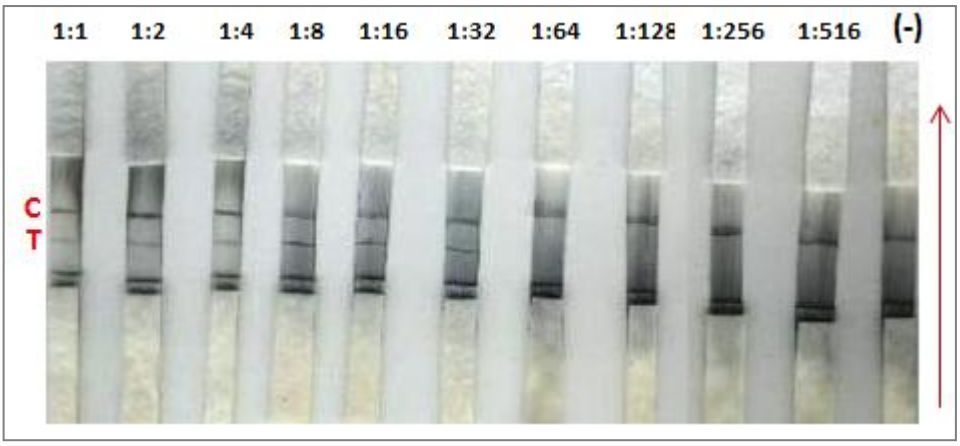

FIGURA 15: **Limite de detecção de pneumolisina por *dipstick* com conjugado anti-Ply/microesfera Estapor Black WO**. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 1 mg/ml. Amostra: Sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae,* em diluição seriada em THY, de 1:1 a 1:512. (-) *Dipstick* controle negativo - amostra: THY. Temperatura de incubação: 28 ° C; Tempo de corrida: 15 min; MN HF 180.

De acordo com o critério estimativo descrito para o experimento do item anterior, com a curva padrão de Ply no western blotting (FIGURA 14), o *dipstick* com anti-Ply foi capaz de detectar pneumolisina nativa até a diluição de 1/32 do sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae*, inferindo-se um nível de detecção de Ply ≤ 9.7 ng/ml dividindo-se a menor concentração de Ply avaliada na curva padrão (310 ng/ml) pela maior diluição do sobrenadante onde foi detectada a Ply (1/32). No entanto, esse dispstick utilizando anti-Ply como anticorpo de detecção foi incapaz de identificar a bactéria em suspensão.

5.4 *DIPSTICK* UTILIZANDO ANTICORPO DE DETECÇÃO CONJUGADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO COLOIDAL

A utilização do ouro coloidal como partícula de conjugação trata-se de uma tecnologia bem estabelecida e amplamente utilizada em diversos trabalhos científicos (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011). NGOM (2010) em uma revisão de literatura constatou que 75% dos 72 artigos analisados eram de publicações sobre ensaios inumocromatográficos que utilizaram o ouro coloidal como reagente na detecção de analitos.

Neste trabalho, a conjugação de anticorpos de detecção com nanoparticulas de ouro, foi conduzida segundo protocolo de Oliver (2010).

A formação da suspensão de ouro coloidal envolve a redução de Au^{3+} para Au° pela ação do citrato de sódio como agente redutor, resultando na formação de nanopartículas com tamanhos definidos (OLIVER-HOYO; GERBER, 2007).

O protocolo de conjugação do ouro coloidal com os anticorpos possui vantagens quando comparado ao dos demais protocolos das partículas testadas neste estudo: (i) o processo de conjugação do ouro coloidal possui menos etapas; (ii) a conjugação não requer períodos longos de incubação; (iii) a concentração de anticorpos necessária para estabilizar o ouro coloidal e promover o acoplamento do anticorpo/ouro é baixa; (iv) existe a possibilidade de se determinar visualmente a concentração adequada de anticorpo necessária para estabilizar o ouro coloidal.

Os coloides de ouro são instáveis na presença de soluções iônicas e se tornam estáveis quando conjugados com quantidade adequada de proteínas (ROCHA, 2012), determinada visualmente pela cor da solução.

O ensaio para quantificar a concentração de anticorpos necessária para estabilizar o ouro coloidal foi feito a partir de diluições seriadas do anticorpo, adicionadas a alíquotas de 100 µl de ouro, como descrito no item 4.6 de Materiais e Métodos. Após a incubação de 10 minutos e adição de 11 µl de solução salina a 10%, foi possível visualizar a concentração de anticorpos necessária para estabilizar o ouro coloidal, através da alteração da cor da suspensão (FIGURA 16). Nos tubos onde a concentração de anticorpos estava adequada, a suspensão tinha coloração rosada (FIGURA 16 – 1 e 2). A mudança de cor é um indicativo de baixa concentração de anticorpos, o que torna os colóides insaturados e instáveis,

precipitando no fundo do tubo e deixando o sobrenadante azul acinzentado (FIGURA 16 – 3, 4, 5, 6) (OLIVER, 2010).

Em nossos experimentos, a quantidade adequada de Igs anti-WCPV e anti-Ply para estabilização do ouro coloidal foram semelhantes, variando de 25 a 50 µg de anticorpo para cada ml de ouro, e a FIGURA 16 ilustra um desses ensaios.

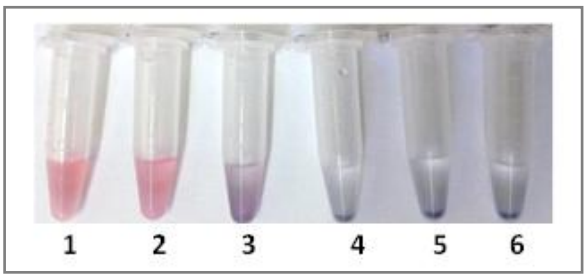

FIGURA 16: Determinação da concentração ótima de anticorpos para estabilização do ouro coloidal. **1-6** – Diluição seriada do anti-Ply: **(1)** 50 µg/ml; **(2)** 25 µg/ml; **(3)** 12,5 µg/ml; **(4)** 6,25 µg/ml; **(5)** 3,15 µg/ml; **(6)** 1,56 µg/ml, com 100 µl de ouro coloidal.

5.4.1 BLOQUEIO DA PORÇÃO DA AMOSTRA (*SAMPLE PAD*)

Na tentativa de diminuir a deposição inespecífica de reagentes na linha teste do *dipstick*, o que poderia ocasionar resultados falso-positivos e invalidação do teste pelo aparecimento de reação na linha teste do *dipstick* controle, foram feitos ensaios de bloqueio da MN através do pré-tratamento com BSA em diferentes concentrações. Este procedimento, entretanto, prejudicou bastante o fluxo ascendente da amostra na MN. Passamos, então, a avaliar o tratamento do filtro absorvente da amostra com um agente tensoativo como $Tween_{20}$ ou Triton X-100 e proteínas de bloqueio, na tentativa de compensar a redução da taxa de fluxo causada pelo bloqueio da MN (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011; MILLIPORE, 2008). Trabalhos anteriores descrevem a utilização de BSA como solução bloqueadora na porção da amostra, para diminuir as ligações inespecíficas na linha teste do *dipstick* (ROCHA, 2012; WIRIYACHAIPORN et al., 2012). No entanto, constatamos que o BSA adicionado em concentrações de 0,1%; 0,5% e 1% não diminuiu a deposição inespecífica e concentrações acima de 1% prejudicavam a subida do analito até as linhas de captura. Realizamos um trabalho exaustivo com diferentes soluções bloquedoras para pré-tratamento da porção da amostra do *dipstick* (descrito em Materiais e Métodos, item 4.8),

utilizando tampão borato, 10 mM, pH 8,5 contendo diferentes concentrações de BSA, caseína ou PEG, associados a diferentes concentrações de Tween 20 ou Triton X-100.

Os *dipsticks* onde a porção da amostra foi pré-tratada com tampão borato 10 mM, pH 8,5 com Triton X-100 ou $Tween_{20}$ e BSA 1% apresentaram deposição inespecífica na linha teste do *dipstick* controle, levando a testes falso-positivos (FIGURA 17 B1; B2; B4; B5). A adição de PEG, tanto nos tampões de conjugação, quanto no tampão de pré-tratamento do papel de filtro absorvente da porção da amostra, não influenciou na diminuição da coloração inespecífica (dados não mostrados).

Quando utilizamos tampão borato 10 mM com $Tween_{20}$ 0,5% e caseína nas concentrações de 0,1% ou 1%, as linhas se mostraram adequadamente visíveis no dipstick teste e não houve deposição inespecífica de reagentes no *dipstick* controle (FIGURA 17 B3; B6), validando o ensaio.

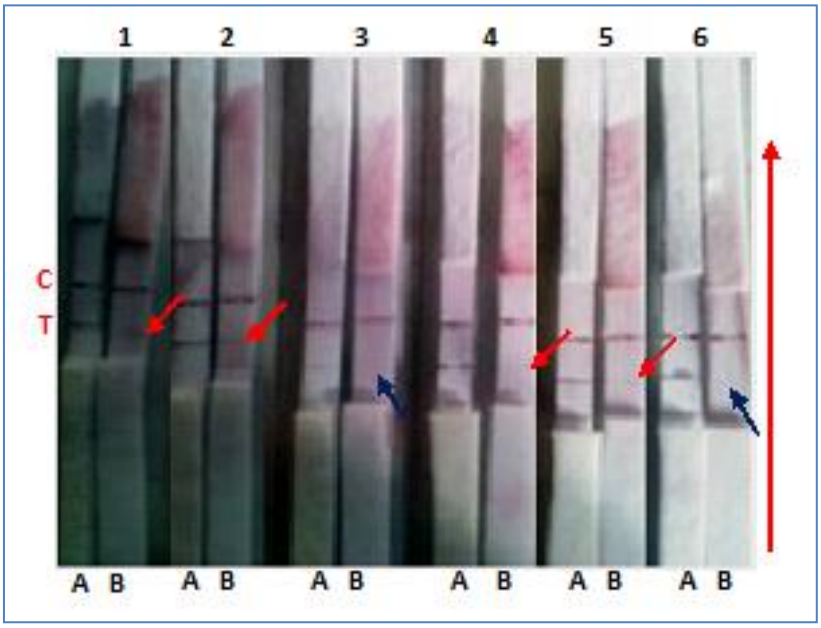

FIGURA 17: **Bloqueio da Porção da amostra (*sample pad)***: Conjugado: Anti-WCPV [1 mg/ml]/ouro coloidal; Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 [1 mg/ml]; Ac de Captura linha controle (C): IgG anti-mouse [0,5 mg/ml] **A)** Dispstick teste – Amostra: suspensão de *S. pneumoniae* 10^8 UFC/ml em PBS; **B)** *Dispstick* controle negativo - Amostra: PBS. **1)** Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Triton X-100 1%, BSA 1%; **2)** Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Triton X-100 0,5%, BSA 1%; **3) Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Tween $_{20}$ 0,5%, Caseína 1%**; **4)** Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Tween $_{20}$ 1%, BSA 1%; **5)** Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Tween $_{20}$ 0,5%, BSA 1%; **6) Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Tween $_{20}$ 0,5%, Caseína 0,1%**. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 10 min; MN HF 180.

Em outro experimento, foi avaliada a reprodutibilidade do teste nessas mesmas condições, onde pode ser comprovada a adequação do tampão de bloqueio da porção da amostra do *dipstick*, nas duas concentrações avaliadas de caseína, 0,1% (FIGURA 17A) e 1% (FIGURA 17B), levando ao aparecimento específico de linhas nítidas nas amostras teste e ausência de linhas nos controles (FIGURA 18).

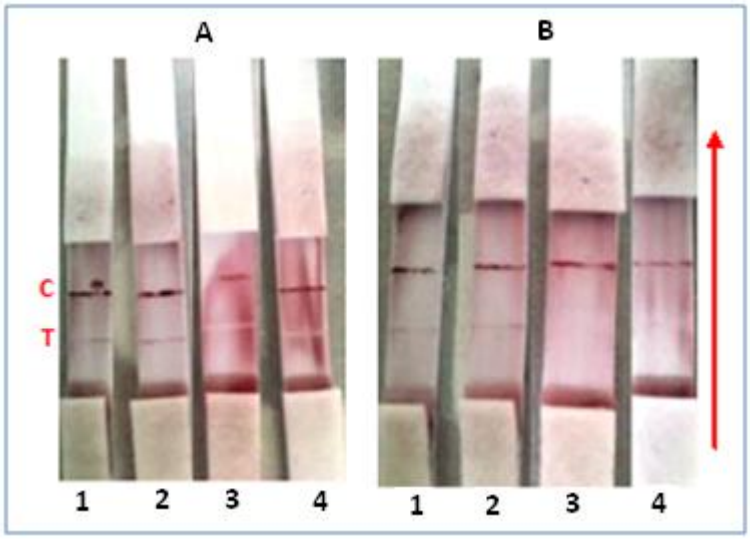

FIGURA 18: **Reprodutibilidade do Bloqueio da Porção da amostra (*sample pad)***: Conjugado: Anti-WCPV [1 mg/ml]/ouro coloidal; Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 [1 mg/ml]; Ac de Captura linha controle (C): IgG anti-mouse [0,5 mg/ml]. **Tratamento da porção da amostra: A)** Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Tween $_{20}$ 0,5%, Caseína 0,1%; **B)** Tampão Borato, 10 mM, pH 8,5, Tween $_{20}$ 0,5%, Caseína 1%; **1)** Amostra: cultivo de *S. pneumoniae,* 10^8 UFC/ml em THY; **2)** Amostra: Sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae*; **3)** Amostra**:** THY; **4)** Amostra: PBS. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 10 min; MN HF 180.

5.4.2 ESCOLHA DA MEMBRANA DE NITROCELULOSE (MN)

A MN é considerada o material mais importante do teste, pois é determinante na atuação de forças de capilaridade para carregar, reagir, selecionar e promover a detecção da amostra (MILLIPORE, 2008). Em nosso estudo, foram utilizadas MNs de diferentes porosidades, determinadas em função da variação no tempo de fluxo capilar (TFC), ou seja, no tempo de deslocamento do fluido na membrana (item 4.9, TABELA 4). Esta é uma consideração importante na escolha de membranas, pois o TFC interfere tanto no tempo de

corrida quanto na sensibilidade do ensaio (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011; MILLIPORE, 2008).

Em nossos ensaios com as diferentes MNs, obtivemos o melhor desempenho de fluxo capilar e deposição do conjugado utilizando a HF 180 (TFC = 180, o fluído leva em torno de 45 segundos para percorrer um cm) (FIGURA 19). Essa escolha foi baseada na maior nitidez das linhas teste e controle do *dipstick*, relacionada à sensibilidade da membrana e adequação do fluxo no sistema em estudo (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011; GEERTRUIDA et al., 2009; HENDERSON; STEWART, 2002; MILLIPORE, 2008). Note-se na FIGURA 19 – 3, onde todos os *dipsticks* foram avaliados para amostras controle (THY), o aparecimento sistemático de linhas para amostras teste (T), denotando o depósito inespecífico de reagentes.

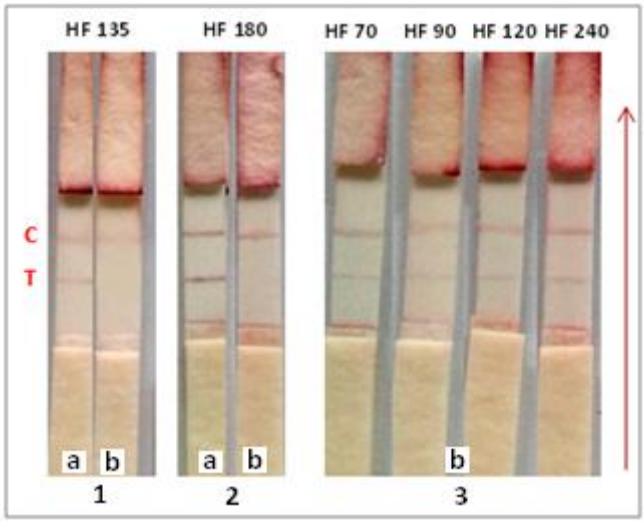

FIGURA 19: **Escolha da MN para confecção dos *dipsticks*** – Conjugado: Anti-Ply [25 µg/ml]/ ouro coloidal; Ac de Captura linha teste (T): AcM D9-43 [1 mg/ml]; Ac de Captura Linha controle (C): IgG de camundongo [0,5 mg/ml]. **1)** MN HF 135; **2)** MN HF 180; **3)** MN HF 70, HF 90, HF 120, HF 240. **a)** Amostra: cultivo de *S.pneumoniae* 10^8 UFC/ml em THY; **b)** Amostra: THY. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 10 min.

5.4.3 *DIPSTICK* CONFECCIONADO COM ANTI-WCPV OU ANTI-PLY, CONJUGADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO: DETECÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE *S. PNEUMONIAE* E PNEUMOLISINA

Foram produzidos *dispsticks* com MN HF180 utilizando como reagente de detecção nanopartículas de ouro coloidal (20 nm de diâmetro a 0,01%) conjugadas com 25 µg/ml de anti-WCPV e como anticorpo de captura o AcM D9-43 [1 mg/ml]. O ensaio foi conduzido utilizando-se como amostras cultivos de 16 horas de isolados clínicos de *S.pneumoniae* de oito diferentes sorotipos (6A, 6B, 18A, 14, 19A, 23F, 9V e 19F), em concentração de 10^8 UFC/ml. Conforme mostra a FIGURA 20, os *dipsticks* foram capazes de detectar os oito sorotipos, que são os mais prevalentes em infecção pneumocócica no Brasil e na América Latina (BRANDILEONE et al., 1998; KERTESZ et al., 1998).

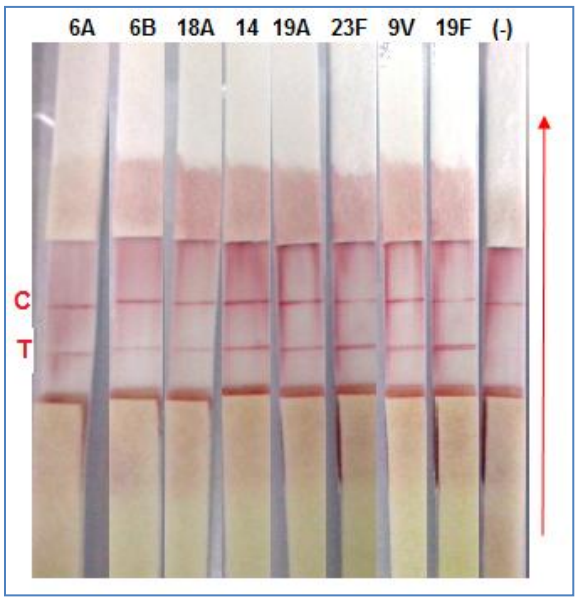

FIGURA 20: **Detecção qualitativa de sorotipos de *S. pneumoniae* por *dipstick:* conjugado anti-WCPV/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)**. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml. Amostra: Cultivo de *S. pneumoniae* em THY, 10^8 UFC/ml. (-) *Dipstick* controle negativo, amostra: THY. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 10 min; MN HF 180.

O mesmo ensaio foi repetido com *dipsticks* utilizando como reagente de detecção nanopartículas de ouro coloidal conjugadas com 25 µg/ml de anti-Ply e como anticorpo de

captura o AcM D9-43 [1 mg/ml] e E10-24 [1 mg/ml], conforme FIGURAS 21 e 22, respectivamente. Podemos observar que os *dipsticks* também foram capazes de detectar *S.pneumoniae* de todos os sorotipos avaliados.

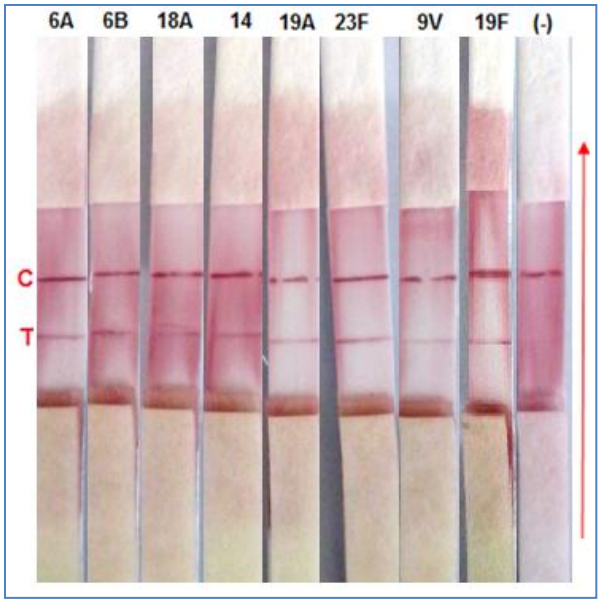

FIGURA 21: **Detecção qualitativa de sorotipos de *S. pneumoniae* por *dipstick:* conjugado anti-Ply/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)**. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml. Amostra: Cultivo de *S. pneumoniae* em THY, 10^8 UFC/ml. (-) *Dipstick* controle negativo, amostra: THY. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 10 min; MN HF 180.

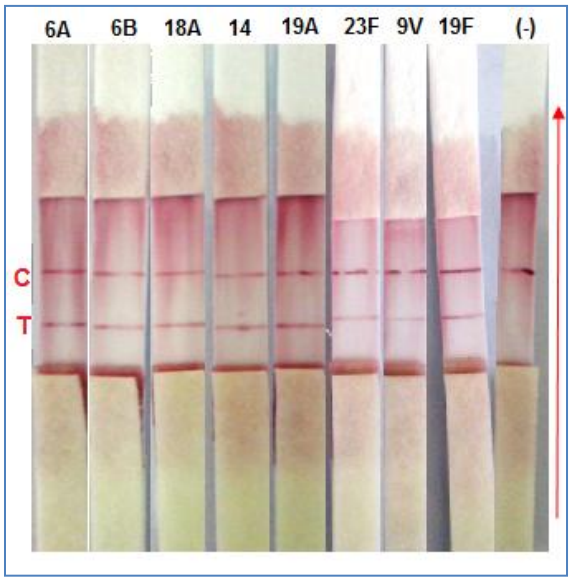

FIGURA 22: **Detecção qualitativa de sorotipos de *S. pneumoniae* por *dipstick:* conjugado anti-Ply/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)**. Ac de captura linha teste (T): AcM E10-24 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml. Amostra: Cultivo de *S. pneumoniae* em THY, 10^8 UFC/ml. (-) *Dipstick* controle negativo, amostra: THY. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 10 min; MN HF 180.

Analisamos quantitativamente o limite de detecção do dispositivo, em cultivo de isolado clínico de *S.pneumoniae* (isolado P741 sorotipo 6B). O *dipstick* utilizando como partícula reveladora ouro coloidal conjugado com anti-WCPV e como anticorpo de captura o AcM D9-43, foi capaz de detectar células de *S. pneumoniae* até uma concentração de 10^4 UFC/ml (FIGURA 23). Este resultado coincidiu com o do ensaio realizado com *dipstick* anti-WCPW conjugado com microesferas Estapor (FIGURA 12).

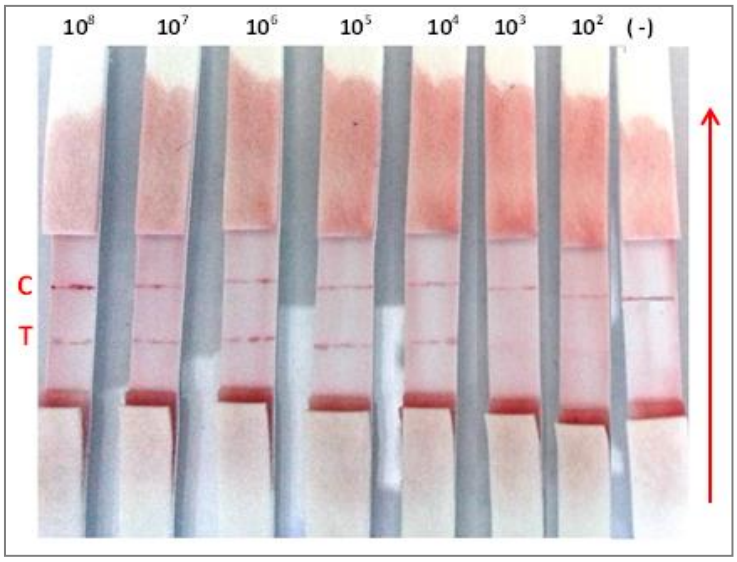

FIGURA 23: **Limite de detecção de *S. pneumoniae* por *dipstick* com conjugado anti-WCPV/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)**. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml. Amostra: Suspensão de *S. pneumoniae* em PBS*:* 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4 e 10^3 UFC/ml). (-) *Dipstick* controle negativo, amostra: PBS. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 10 min; MN HF 180.

Avaliamos também a capacidade do *dipstick* de detectar a pneumolisina em sua forma nativa, em sobrenadantes de cultura de *S. pneumoniae,* utilizando a mesma construção do ensaio anterior (anticorpo de detecção anti-WCPV/ouro coloidal e anticorpo de captura AcM D9-43).

Como amostra, foi utilizado o sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae* em diluição seriada em THY, até 1: 128 (FIGURA 24). A estimativa em termos quantitativos do limite de detecção de pneumolisina nativa pelo *dipstick* foi feita a partir da curva padrão obtida no ensaio de western blotting descrito no item 5.3.3, FIGURA 14.

De acordo com os resultados observados na FIGURA 24, o *dispstick* foi capaz de detectar pneumolisina nativa a uma diluição de 1: 16 no sobrenadante de cultivo, ou uma concentração estimada ≤ 19.3 ng/ml, resultado que corrobora o limite de detecção obtido com o *dipstick* utilizando anti-WCPV conjugado com microesferas Estapor (item 5.3.3 FIGURA 13).

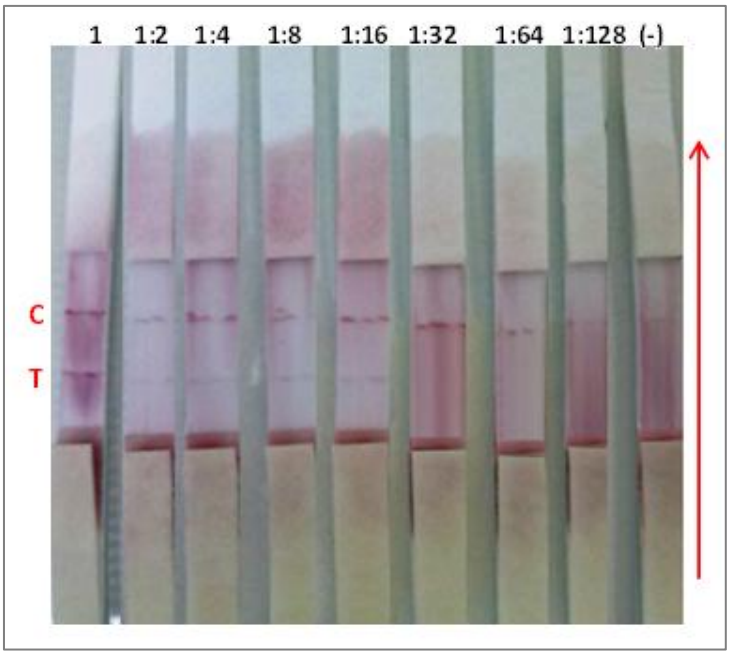

FIGURA 24: **Limite de detecção de pneumolisina por *dipstick* com conjugado anti-WCPV/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)**. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml; Amostra: Sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae,* em diluição seriada em THY, de 1:1 a 1:128. (-) *Dipstick* controle negativo, amostra: THY. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 10 min; MN HF 180.

Analisamos o limite de detecção em suspensão de *S. pneumoniae,* de um *dipstick* utilizando como partícula reveladora o ouro coloidal conjugado com anti-Ply e como anticorpo de captura o AcM D9-43. Apesar de o *dipstick* ter detectado o pneumococo até uma concentração de 10^5 UFC/ml (FIGURA 25), a linha teste apresentou coloração bastante fraca, prejudicando a visualização. O mesmo ensaio, utilizando as microesferas Estapor conjugadas ao anti-Ply não foi capaz de detectar *S.pneumoniae* em suspensão bacteriana.

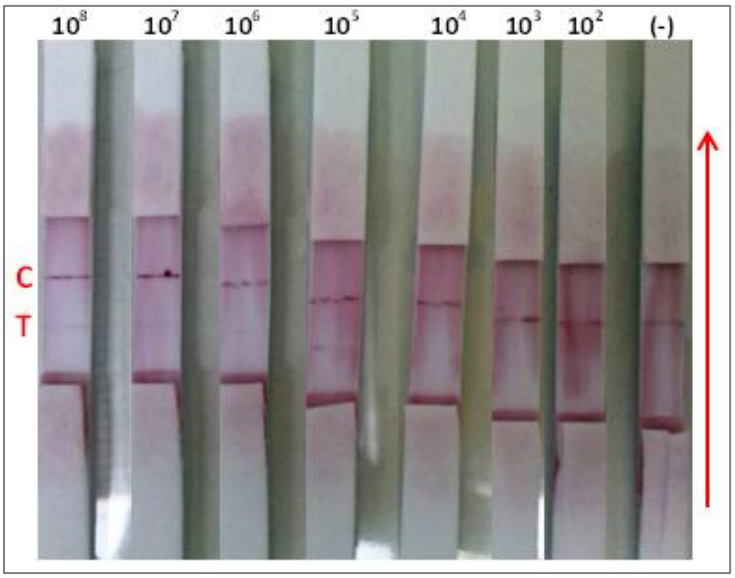

FIGURA 25: **Limite de detecção de *S. pneumoniae* por *dipstick* com conjugado anti-Ply/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)**. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml. Amostra: *S. pneumoniae:* 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4,10^3 e 10^2 UFC/ml), em PBS. (-) *Dipstick* controle negativo, amostra: PBS. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 10 min; MN HF 180.

D*ispsticks* confeccionados com a mesma construção anterior foram testados em amostra de sobrenadante de cultivo de 16 horas de *S. pneumoniae*, com aproximadamente 10^8 UFC/ml. Esses dispositivos detectaram a pneumolisina nativa até a diluição de 1/16 do sobrenadante (FIGURA 26), um limite estimado de concentração da proteína ≤ 19.3 ng/ml de acordo com o mesmo cálculo descrito no item 5.3.3 (FIGURAS 13 e 14).

Esse resultado demonstra um limite de detecção semelhante ao dos *dipsticks* anti-Ply conjugados com microesferas Estapor (≤ 9,7 ng/ml) (FIGURA 15) e com os *dipsticks* utilizando anti-WCPV conjugados com microesferas Estapor (FIGURA 13) ou ouro coloidal (FIGURA 24).

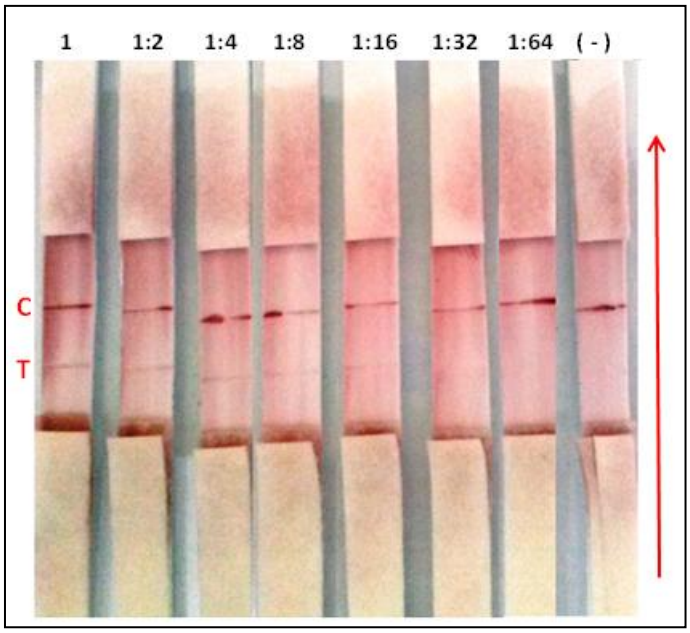

FIGURA 26: **Limite de detecção de pneumolisina por *dipstick* com conjugado anti-Ply/ ouro 0,01% (Sigma-Aldrich)**. Ac de captura (linha teste) AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle IgG anti-mouse 0,5 mg/ml; MN HF 180. Amostra: Sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae,* em diluição seriada em THY, de 1:1 a 1:64. (-) *Dipstick* controle negativo - amostra: THY. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 10 min; MN HF 180.

Tendo em vista que *dipsticks* confeccionados com microesferas Estapor conjugadas a anti-WCPV foram incapazes de detectar a pneumolisina recombinante (Ply) (FIGURA 9), avaliamos também essas condições, em *dipstiks* com ouro coloidal conjugado a anti-WCPV ou anti-Ply, utilizando como anticorpo de captura o AcM D9-43 ou E10-24 (FIGURA 27). Do mesmo modo, esses *dipsticks* também não detectaram a Ply, possivelmente devido ao bloqueio de algum sítio de ligação do anticorpo, quando conjugado às partículas coloidais coloridas (ouro ou microesferas Estapor). Deve-se ressaltar que os soros de camundongo anti-Ply, utilizados nestes ensaios, foram capazes de detectar a Ply por ELISA, tanto antes quanto após a precipitação das Igs.

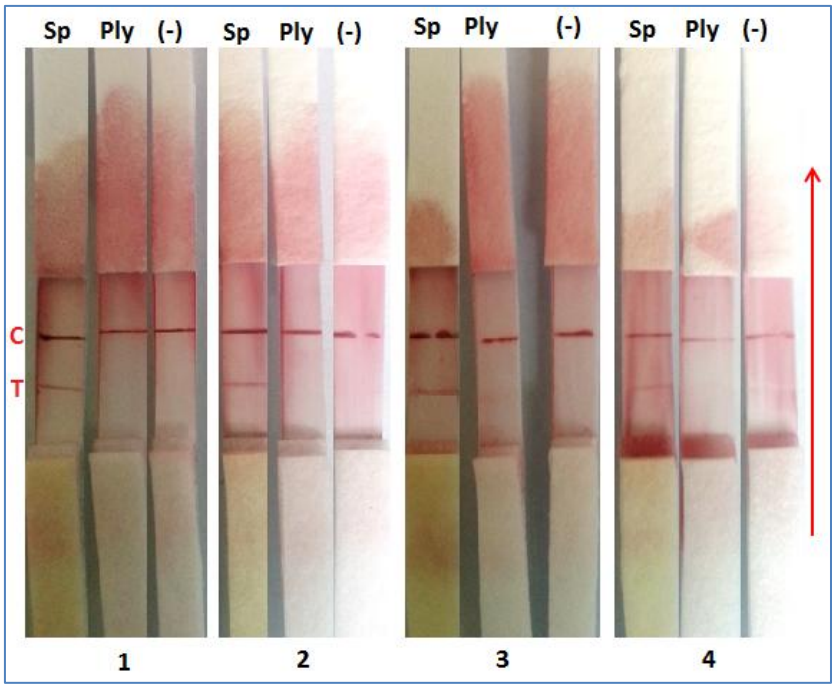

FIGURA 27: **Detecção de *S. pneumoniae* ou de pneumolisina recombinante (Ply) por anti-WCPV conjugado com ouro coloidal 0,01% (Sigma-Aldrich)**. **1)** Conjugado: anti-WCPV/ouro. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; **2)** Conjugado: anti-WCPV/ouro. Ac de captura linha teste (T) AcM E10-24 1 mg/ml; **3)** Conjugado: anti-Ply/ouro. Ac de captura linha teste (T) AcM D9-43 1 mg/ml; **4)** Conjugado: anti-Ply/ouro. Ac de captura linha teste (T) AcM E10-24 1 mg/ml. Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml; **Sp:** Amostra - cultivo de *S. pneumoniae* 10^8 UFC/ml; **Ply (amostra):** 100 µg/ml em THY; (-) *Dipstick* controle negativo - amostra: PBS. Temperatura de incubação: 25°C; Tempo de corrida: 10 min; MN HF 180.

5.5 ESTABILIDADE DO REAGENTE DE DETECÇÃO

A vida útil de um produto pode ser definida como o intervalo de tempo no qual as características de desempenho são mantidas sob condições específicas de armazenamento e manuseio (BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011). Em testes de controle de qualidade a vida útil do produto comumente é avaliada por ensaios de estabilidade acelerada, embora o teste de estabilidade em tempo real seja necessário para validar a estabilidade química dos reagentes e materiais de referência (ANDERSON; SCOTT, 1991; BANDLA; THOMPSON; SHAN, 2011).

Em nosso estudo, em virtude da limitação da quantidade de reagentes e da dinâmica de execução dos experimentos, não foi possível uma avaliação acurada da estabilidade dos

dipsticks como produto final. Procuramos, na medida do possível, obter respostas temporais da atividade de alguns dos componentes do *dipstick*, no período de tempo em que dispúnhamos de amostras desses componentes.

Assim, avaliamos a estabilidade de conjugados anti-Ply e anti-WCPV no sistema de microesferas Estapor e ouro coloidal. Os testes foram feitos com conjugados liofilizados e preparados para uso, aderidos à membrana de fibra de vidro (item 4.7 de Materiais e Métodos) e mantidos em dessecador de vidro a vácuo por diferentes períodos de tempo. A FIGURA 28 ilustra o experimento com conjugados anti-WCPV/microesfera Estapor, estocados por 2; 76; 140; 293 ou 382 dias e utilizados em *dipsticks* com anticorpo de captura D9-43, na detecção de células de *S. pneumoniae* em cultivo. Pode-se observar que houve diminuição da estabilidade do conjugado a partir do período de 140 dias, notando-se deposição inespecífica do conjugado na linha teste do *dipstick* controle (-) e conforme o tempo de armazenamento se prolongou (293 e 382 dias), percebemos que a linha inespecífica do teste controle se intensificou.

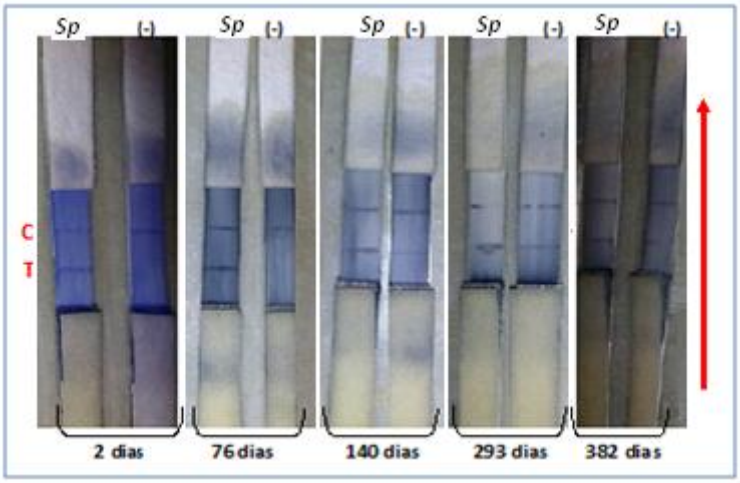

FIGURA 28: **Teste de estabilidade de conjugado utilizando Microesfera Estapor como reagente de detecção**: Conjugado anti-WCPV/ Microesfera Estapor. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml. Tempo de armazenamento após conjugação com anticorpo de detecção: 2, 76, 140, 293 e 382 dias; *Sp*: amostra - cultivo de *S. pneumoniae,* 10^8 UFC/ml; (-) *Dipstick* controle negativo - amostra: THY. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 15 min; MN HF 180.

Conjugados utilizando anti-WCPV/ourocoloidal foram armazenados por 12; 76 ou 217 dias e avaliados em dipsticks para a identificação de células de *S. pneumoniae* em cultivo (FIGURA 29). Por esse ensaio, podemos observar que o conjugado se manteve estável até pelo menos 217 dias de armazenamento antes do uso, com linha teste bastante nítida nos *dipsticks* testes e sem deposição inespecífica nos controles.

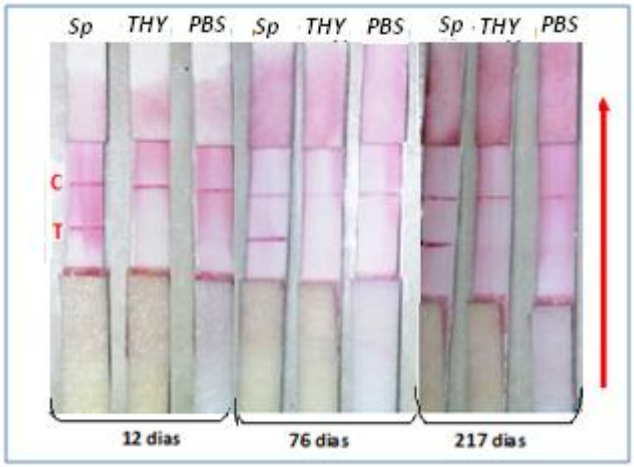

FIGURA 29: **Teste de estabilidade do ouro coloidal como reagente de detecção:** Conjugado anti-WCPV/ ouro coloidal. Ac de captura linha teste (T): AcM D9-43 1 mg/ml; Ac de captura linha controle (C): IgG anti-mouse 0,5 mg/ml. Tempo de armazenagem após conjugação com anticorpo de detecção: 12 dias, 76 dias e 217 dias. *Sp*: Amostra - cultivo de *S. pneumoniae,* 10^8 UFC/ml; *Dipsticks* controle negativos - amostra: THY ou PBS. Temperatura de incubação: 28 °C; Tempo de corrida: 10 min; MN HF 180.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os *dipsticks* utilizando como reagente de detecção microesferas Estapor ou ouro coloidal conjugados com o anticorpo anti-WCPV ou anti-PLY permitiram níveis de detecção de *S.pneumoniae* bastante parecidos em termos de sensibilidade. Os resultados de análises qualitativas permitiram a detecção de alguns dos principais sorotipos de *S.pneumoniae* (6A, 6B, 18A, 9V, 14, 19F, 19A e 23F), que estão relacionados a clones multirresistentes a antibióticos, são prevalentes em doenças pneumocócicas infantis, e foram identificados em estudo prospectivo de vigilância epidemiológica da América Latina e do Brasil (BRANDILEONE et al., 1998; KERTESZ et al., 1998; MCGEE et al., 2001).

Nas analises quantitativas, os *dipsticks* desenvolvidos neste trabalho mostraram-se sensíveis para detecção de *S. pneumoniae* em cultivo ou em suspensão bacteriana, com desenvolvimento de sinais visíveis entre 10^4 e 10^5 UFC/ml. Esses resultados são relevantes do ponto de vista clínico, tendo em vista que diversos trabalhos na literatura reportam índices dessa ordem de grandeza na detecção bacteriana em condições clínicas, como em pneumonia, meningite, ou sepse. Culturas de escarro baseadas em taxas $\geq 10^5$ UFC/ml podem ser interpretadas como indicativo de infecção (BLASCHKE, 2011). Culturas quantitativas de lavado broncoalveolar apontam para um ponto de corte de 10^4 UFC/ml como um indicativo de diagnóstico de pneumonia (CHASTRE et al., 1989). Um estudo realizado por Feldman (1976) mostrou que dos 27 pacientes com meningite causada por *H. influenzae* tipo b, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* tinham contagens bacterianas no LCR variando de $4,5 \times 10^3$ e $3,0 \times 10^8$ UFC /ml antes da antibioticoterapia. La Scolea e Dryja (1984) em estudo com 2031 amostras clínicas de LCR positivas encontrou em 85% das amostras concentrações de bactérias com contagens superiores a 10^3 UFC/ml e 10^5 CFU/ml. Puerini (2006) em análise quantitativa por PCR de *swabs* da nasofaringe de crianças menores de um ano de idade com infecção pneumocócica, da América do Sul, observou uma taxa de colonização por *S. pneumoniae* entre $1,6 \times 10^4$ e $1,6 \times 10^7$ CFU/ml. Durante episódios de sepse, concentrações de 10^4 UFC/ml em cultura quantitativa de sangue têm sido descritas em humanos (BRAUN, et al., 1999; LA SCOLEA; DRYJA, 1984). Esses achados na literatura em espécimes clínicos veem de encontro ao nível de sensibilidade dos nossos *dipsticks,* na

detecção de *S. pneumoniae* em cultura ou em suspensão em PBS, mesmo tendo-se em vista que a extrapolação de resultados para amostra clínica deva ser considerada com cautela.

Em análise quantitativa para detecção de pneumolisina nativa presente em sobrenadante de cultivo de 16 horas de *S.pneumoniae*, nossos *dipsticks* foram capazes de detectar uma concentração aproximada de pneumolisina entre 9,7 e 19,3 ng/ml presente no sobrenadante do cultivo.

Em geral, as concentrações de pneumolisina inferiores a 100 ng/ml são sublíticas, provocando interferência imunomodulatória ou funcional das células imunitárias, enquanto que em concentrações acima de 100 ng/ml, a pneumolisina possui citotoxicidade direta sobre as células neuronais, ependimais e microgliais (GARCÍA-SUAREZ et al., 2007; SPREER et al., 2003; WALL et al., 2012). Diante dos resultados obtidos neste estudo podemos sugerir que nossos *dipsticks* detectam pneumolisina em concentrações inferiores à descrita como causadora de citotoxidade celular, no entanto é importante ressaltar que mesmo em concentrações sublíticas, a pneumolisina induz resposta inflamatória envolvendo apoptose celular no tecido do hospedeiro (GARCÍA-SUAREZ et al., 2007). Spreer et al. (2003) detectaram, por imunoblot, concentrações entre 0,85 e 180 ng/ml no LCR de doentes com meningite. Em meningite pneumocócica, o efeito citotóxico da pneumolisina pode ser agravado pelo tratamento com antibióticos β-Lactâmicos, que atuando na lise bacteriana, promovem a liberação de compostos intracelulares com efeitos tóxicos (SPREER et al., 2003). Wall (2012) em um estudo prospectivo sugere que um mau prognóstico na meningite pneumocócica pode estar associado a níveis elevados de Ply no líquido LCR. Nesse sentido a detecção de pneumolisina pelo *dipstick* no espécime clínico pode ser um diferencial para a identificação do *S. pneumoniae,* podendo auxiliar ao profissional de saúde na escolha da antibioticoterapia mais adequada para o tratamento.

A proposta de utilização da combinação desses dois *dipsticks,* um com o anticorpo de detecção anti-WCPV e o outro com anti-Ply, no *kit* diagnóstico, pode ser considerada como estratégia para aumentar a sensibilidade e a especificidade do teste. Além disso, a combinação do anticorpo monoclonal como anticorpo de captura e dos policlonais na forma conjugada nos pareceu a melhor alternativa, mas devemos considerar que até o momento estamos utilizando como amostra analitos em soluções ou suspensões celulares

padronizadas e bem estabelecidas, diferentemente das condições de espécimes clínicos, onde essas condições deverão ser reavaliadas, em termos de sensibilidade e especificidade.

ANÁLISE DE CUSTO

Foi feita uma análise de custo para possível estimativa de preço final do *dipstick* desenvolvido neste estudo. A cotação de preços foi feita somente com as membranas e as partículas coradas, não sendo considerado o preço de produção dos anticorpos, o valor dos demais reagentes e a mão de obra. A partir do levantamento de preços das diferentes membranas (PLUS 180 MEMBRANE CARDS, FILTRO EM FIBRA DE CELULOSE e FILTRO EM FIBRE CF 203) e das partículas coloidais (MICROESFERA ESTAPOR e OURO COLOIDAL), inferimos um valor subestimado para cada teste. O preço para o *dipstick* utilizando Microesfera Estapor como reagente de detecção foi de aproximadamente R$ 1,26 por teste, enquanto que *dipstick* desenvolvido com ouro coloidal foi cotado com preço de R$ 9,80 reais por teste. Entretanto, a utilização do ouro coloidal como reagente de detecção, embora a princípio possa parecer uma alternativa mais onerosa, nos pareceu bastante sensível e específica, requerendo quantidade muito menor do anticorpo adsorvido e o custo benefício deve ser levado em consideração. Convém ressaltar que o teste BINAX NOW já existente no mercado possui um valor aproximado de U$ 250,00 o Kit contendo 22 testes, equivalente a R$ 26,91 reais cada teste. Futuramente um estudo financeiro mais criterioso deve ser conduzido para se avaliar o valor comercial do *dipstick*.

CONTINUIDADE DO ESTUDO

Estudos futuros devem ser conduzidos para se avaliar a robustez dos testes *dipsticks* em amostras clínicas. Deve ser feita uma padronização específica no preparo de cada tipo de amostra clínica (sangue, líquor, escarro, urina) para retirada de viscosidade ou proteínas que possam interferir na sensibilidade do teste. Dessa forma, a finalização da etapa de padronização referente ao desenvolvimento do *dipstick* permitirá que ensaios de pré-tratamento das amostras sejam concluídos.

7 CONCLUSÕES

Os testes *dipsticks* desenvolvidos neste estudo são uma promissora ferramenta para o diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae*, pois em análises qualitativas foi possível detectar os principais sorotipos mais prevalentes em doenças invasivas pneumocócicas e em análises quantitativas apresentaram um limite de detecção compatível com a ordem de grandeza na detecção de infecções bacterianas em condições clínicas.

O desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido, sensível, de baixo custo, que possa ser acessível a uma grande parcela da população, em uma área estratégica, certamente é um passo importante, que pode contribuir positivamente como possível ferramenta diagnóstica do agente etiológico causador de doenças pneumocócicas, um patógeno de extrema relevância em saúde pública.

REFERÊNCIAS*

ADEGBOLA, R. A.; OBARO, S. K.; BINEY, E.; GREENWOOD, B. M. Evaluation of Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children in a community with a high carriage rate of pneumococcus. **Pediatr. Infect Dis. J.**, v. 20, p. 718-789, 2001.

ALONSO-TARRÉES, C. et al. False-positive pneumococcal antigen test in meningitis diagnosis. **Lancet**, v. 358, n. 9289, p. 1273-1274, 2001.

ANDERSON, G.; SCOTT, M. Determination of product shelf life and activation energy for five drugs of abuse. **Clin. Chem.**, v. 37, p. 398–402, 1991.

AUSTRIAN R. The Quellung reaction, a neglected microbiologic technique. **Mt. Sinai. J. Med.**, v. 43, p. 699–709, 1976.

ANDREOTTI, P. E.; LUDWIG, G. V.; PERUSKI, A. H.; TUITE, J. J.; MORSE, S. S.; PERUSKI Jr, L. F. Immunoassay of infectious agents. **BioTechniques**, v. 35, p. 850-859, 2003.

ARAI, S. et al. Use of antiserum-coated latex particles for serotyping *Streptococcus pneumoniae*. **Microbiol. Immunol**., v. 45, n. 2, p. 159 –162, 2001.

ARDANUY, C. et al. Epidemiology of Invasive pneumococcal disease in older people in Spain (2007–2009): Implications for Future Vaccination Strategies. **PLoS One,** v. 7, n. 8, 2012.

AUSTRIAN, R. The Quellung reaction, a neglected microbiologic technique. **Mt Sinai J Med.,** v. 43, p. 699–709, 1976.

BANDLA, M.; THOMPSON, R.; SHAN, G. Lateral Flow Devices. **Immunoassays in Agricultural Biotechnology.** John Wiley & Sons, 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470909935.ch5/summary> Acesso em: 20 set. 2012.

BARICHELLO, T. et al. Fisiopatologia da meningite ocasionada pelo *Streptococcus pneumoniae* e os novas possibilidades terapêuticas adjuvantes **Arq. Neuro-Psiquiatr**., v. 70, n. 5, 2012.

BARTLETT, J. G. Decline in microbial studies for patients with pulmonary infections**. Clin Infect Dis.,** v. 39, p. 170–172, 2004.

BHAKDI, L. S.; TRANUM-JENSEN, J.; SZIEGOLEIT, A. Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. **Infect Immun.,** v. 47, n 1, p. 52-60, 1985.

BERKLEY, J. A. et al. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. **N. Engl. J. Med**., v. 352, n. 1, p. 39–47, 2005.

BERRY, A.; PATON, J. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. **Infect. Immun.,** v. 68, p. 133–140, 2000.

---

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERRY, A. M. et al. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.,** v. 57, p. 2324–2330, 1989.

BLASCHKE, A. J. Interpreting Assays for the Detection of *Streptococcus pneumonia*. **Clin. Infect. Dis**., v. 52, p. S331-S337, 2011.

BLASI, F. et al. Understanding the burden of pneumococcal disease in adults**. Clin. Microbiol. Infect**., v. 18, p. 1–8, 2012. Suppl. 5.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect. Dis.,** v. 4, p. 144–154, 2004a.

BRANDILEONE M. C. et al. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from Brazilian children with invasive infections. Pneumococcal Study Group in Brazil for the SIREVA Project. Regional Systems for Vaccines in Latin America. **Microb. Drug Resist.,** v. 3, n. 2, p. 141–146, 1997.

BRANDILEONE M. C. et al. Geographic distribution of penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Brazil: genetic relatedness. **Microb. Drug Resist**., v. 4, n. 2, p. 209-217, 1998.

BRANDILEONE M. C. et al. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. **Vaccine,** v. 28, p. 3890-3896, 2004.

BRAUN, J. S. et al. Pneumolysin, a Protein Toxin of *Streptococcus pneumoniae*, Induces Nitric Oxide Production from Macrophages. **Infect. Immun**., v. 67, n. 8, p. 3750–3756, 1999.

BRILES, D. E. et al. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun**., v. 68, n. 2, p. 796-800, 2000a.

BRILES, D. E. Immunization of humans with rPspA elicits antibodies, which passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 1694-1701, 2000b.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S.; BROOKS-WALTER, A. et al. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. **Vaccine,** v. 18, p. 1707–1711, 2000c.

BROOKS-WALTER, A.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD S. K. The pspC Gene of *Streptococcus pneumonia* Encodes a Polymorphic Protein, PspC, Which Elicits Cross-Reactive Antibodies to PspA and Provides Immunity to Pneumococcal Bacteremia**. Infect. Immun.,** v. 67, n. 12, p. 6533-6542, 1999.

BROWN, E.; HOSEA, S.; FRANK, M. The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. **Rev. Infect. Dis**., v. 4, p. S797–S805, 1983.

BROWNE, K.; MIEGEL, J.; STOTTMEIER, K. D. Detection of pneumococci in blood cultures by latex agglutination. **J. Clin. Microbiol**., v. 19, p. 649–650, 1984.

BURMAN, L. A. et al. Diagnosis of pneumonia by cultures, bacterial and viral antigen detection tests, and serology with special references to antibodies against pneumococcal antigens. **J. Infect. Dis.,** v. 163, p. 1087-1093, 1991.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Updated recommendations for prevention of nvasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). **MMWR,** v.59, n. 34, p. 1102–1106, 2010.

CHASTRE, J. et al. Quantification of BAL Cells Containing Intracellular Bacteria Rapidly Identifies Ventilated Patients with Nosocomial Pneumonia. **CHEST J.**, v. 95, n. 3, p. 190S-192S, 1989.

DAGAN, R. Antibiotic resistance and the potential impact of pneumococcal conjugate vaccines. **Commun. Dis. Intell**. **Q. Rep**., v. 27, p. 134-142, 2003.

DAGAN, R. et al. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. **Pediatr. Infect. Dis. J**., v. 17, p. 880-885, 1998.

DAGAN, R. et al. Nasopharyngeal colonization in Southern Israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life: relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines. **J. Infect. Dis**., v. 174, p. 1352-1352, 1996.

DAGAN, R.; POOLMAN, C. A. Siegrist Glycoconjugate vaccines and immune interference: a review. **Vaccine,** v. 28, p. 5513–5523, 2010.

DAVIDSON, H. H. et al. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* Urinary Antigen Test in Children with Nasopharyngeal Pneumococcal Carriaged, **Clin Infect Dis**., v. 34, n. 7, p. 1025-1028, 2002.

DAVIS, T. E.; FULLER, D. D.; AESCHLEMAN, E. C. Rapid, direct identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* from blood cultures using commercial immunologic kits and modified conventional tests. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**., v. 15, p. 295–300, 1992.

DAWSON C. What is a pneumococcus? In: IVOMANEM E. M. T.; MARRISON, D. A.; SPRATT, B. G. (Ed.). **The Pneumococcus.** Washington, DC: ASM Press, 2004. p. 30-48.

DENYS, G. A.; CAREY, R. B. Identification of *Streptococcus pneumoniae* with a DNA probe. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 2725–2727, 1992.

DOMINGUEZ, J. et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine. **Chest**, v. 9, p. 119-243, 2001.

DORCA, J. et al. Efficacy, safety, and therapeutic relevance of transthoracic aspiration with ultrathin needle in nonventilated nosocomial pneumonia. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 151, p. 1491–1496, 1995.

DOCKRELL, D. H.; WHYTE, M. B.; MITCHELL, T. J. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. **Chest**, v. 142, n. 2, p 482-491, 2012.

DOWELL, S. F. et al. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32 p. 824-825, 2001.

ESPOSITO, S. et al. A etiology of acute pharyngitis: the role of atypical bacteria. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 645–651, 2004.

FELDMAN, W. E. Concentrations of bacteria in cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis. **J. Pediatr**., v. 88, n. 4, p. 549-552, 1976.

FINE, M. J. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. **JAMA**, v. 275, p. 134-141, 1996.

GARCÍA-SUÁREZ, M. M. et al. Performance of a pneumolysin enzyme-Linked immunosorbent assay for diagnosis of pneumococcal infections. **J. Clin. Microbiol**., v. 45, n. 11, p. 3549-3554, 2007.

GARDAM, M. A.; MILLER, M. A. Optochin revisited: defining the optimal type of blood agar for presumptive identification of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol**., v. 36, p. 833–834, 1998.

GEERTRUIDA, A. et al. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 569–582. 2009.

GEISELER, P. J. et al. Community acquired purulent meningitis: a review of 1,316 cases during the antibiotic era, 1954–1976. **Rev. Infect. Dis**., v. 2, p. 725–745, 1980.

GEOGHEGAN, W. The effect of three variables on adsorption of rabbit IgG to colloidal gold. J. Histochem. **Cytochemistry**, v. 36, p. 401, 1988.

GISSELSSON-SOLÉN, M. et al. The Binax NOW test as a tool for diagnosis of severe acute otitis media and associated complications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3003–3007, 2007.

GOLDSTEIN, F. W.; ACAR, J. F. Antimicrobial resistance among lower respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae*: results of a 1992–1993 western Europe and USA collaborative surveillance study. The Alexander project collaborative group. **J Antimicrob Chemother,** v. 38, p. 71-84, 1996.

GONÇALVES, V. M. et al. Development of a whole cell pneumococcal vaccine: BPL inactivation, cGMP production, and stability. **Vaccine,** v. 19, p. 1113‑1120, 2014.

GUNN, F. D.; NUNGESTER, W. J. Pathogenesis and histopathology of experimental pneumonia in rats. **Arch. Pathol**., v. 21, p. 813–830, 1936.

GRABENSTEIN, J. D; KLUGMAN, K. P. A century of pneumococcal vaccination research in humans - Merck Vaccines, West Point, USA. **Clin. Microbiol. Infect.,** v. 18, p. 1–10, 2012.

GRANOFF, D. M. et al. Induction of immunologic refractoriness in adults by meningococcal C polysaccharide vaccination. **J. Infect. Dis**., v. 178, p. 870–874, 1998.

GRATTEN, M. Comparison of goat and horse blood as culture medium supplements for isolation and identification of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* from upper respiratory tract secretions. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2871-2872, 1994.

GRIBNAU, T. C. J.; VAN SOMMEREN, A.; VAN DINTHER, F. DIA-disperse dye immunoassay. In: CHAIKEN, M.; WILCHEK; PARIKH, I. (Ed.). **Affinity chromatography and biological recognition**. Orlando: Academic Press, 1983. p. 375–380.

GRIBNAU, T. C. J.; LEUVERING, J. H. W.; HELL. V. H. Particle-labelled immunoassays: a review. **J. Chromatogr.**, v. 376. p. 175-189, 1986.

GUTIERREZ, F. et al. Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community acquired pneumonia in Spain. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36 p. 286–292, 2003.

HAMER, D. H. et. al. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. **Clin. Infect Dis.**, v. 34, p. 1025–1028, 2002.

HENDERSON, K.; STEWART, J. Factors influencing the measurement of oestrone sulphate by dipstick particle capture immunoassay. **J. Immunol. Methods**, v. 270, n. 1, p. 77–84, 2002.

HENDLEY, O. et al. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccines in 18-month-old infants. **Pediatrics**, v. 80, p. 351–354, 1987.

HOLMBERG, H.; KROOK, A.; SJOGREN, A. Determination of antibodies to pneumococcal C polysaccharide in patients with community-Acquired pneumonia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, n. 5, p. 808-881, 1985.

HIRST, R. A et al. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 138, p. 195–201, 2004.

HOLLINGSHEAD, S. K.; BECKER, R.; BRILES, D. E. Diversity of pspA: Mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumonia*. **Infect. Immun**., v. 68, n. 10, p. 5889-5900, 2000.

JEDRZEJAS, M. J.; LAMANI, E.; BECKER, R. S. Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. **J. Biol. Chem**., v. 276, p. 33121–33128, 2001.

JENNINGS, H. J; LUGOWSKI, C; YOUNG, N. M. Structure of the complex polysaccharide C substance from *Streptococcus pneumoniae* type 1. **Biochemistry**, v. 19, p. 4712-4719. 1980.

JIANG, T.; LIANG, Z.; REN W. W. et al. A simple and rapid colloidal gold-based immunochromatografic strip test for detection of FMDV serotype A. **Virologica Sinica.** v. 26, n. 1, p. 30-39, 2011.

JONES, K. D. Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes. Part 2: common problems. **IVD Technol**., 1999. Disponível em: <http://www.ivdtechnology.com/article/troubleshooting-protein-binding-nitrocellulose-membranes> Acesso em: dez 2013

JONSSON, S. et al. Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. **J Infect Dis.**, v. 152, p. 4–13, 1985.

KADIOGLU, A. et al. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. **Infect. Immun**., v. 70, p. 2886–2890, 2002.

KADIOGLU, A.; COWARD, W.; COLSTON, M.; HEWITT, C.; ANDREW, P. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. **Infect. Immun**., v. 72, p. 2689–2697, 2004.

KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; PATON, J. C.; ANDREW, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat. Rev. Microbiol**., v. 6, n. 4, p. 288-301, 2008.

KANCLERSKI, K.; GRANSTROM, M.; MOLLBY, R. Immunological relation between serum antibodies against pneumolysin and against streptolysin O. **Acta Pathol**. **Microbiol. Immunol. Scand. Sect**., v. 95, n. 4, p. 241–244, 1987.

KAPLAN S. L., et al. Decrease of invasive pneumococcal infections among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. **Pediatrics**, v. 113, p. 443-449, 2004.

KAPLAN, S. L et al. Serotype 19A is the most common serotype causing invasive pneumococcal infections in children. **Pediatrics**, v. 125, p. 429-436, 2010.

KAWAGUCHI, H. K.; SAKAMOTO, Y.; OHTSUKA, T.; OHTAKE, H.; SEKIGUCHI, H. I. Fundamental study on latex reagents for agglutination tests. **Biomaterials**, v. 10, p. 225-229, 1989.

KELLOGG, J. A. et al. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. **J. Clin. Microbiol.,** v. 39, p. 3373–3375, 2001.

KERTESZ, D. A. et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the pan pmerican health organization surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 1355–1361, 1998.

KIM, J. O.; WEISER, J. N. Association of Intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 2, p. 368-377, 1998.

KLUGMAN, K. P.; MADHI, S.A.; ALBRICH, W. C. Novel approaches to the identification of *Streptococcus pneumoniae* as the cause of community-acquired pneumonia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, p. S202–S206, 2008. Suppl. 3.

LA SCOLEA JR, L. J.; DRYJA, D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. **J. Clin. Microbiol**., v. 19, n. 2, p. 187–190, 1984.

LAHTI, E. et al. Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia and empyema in children. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.,** v. 25, p. 783–789, 2006.

LAVAL, C. B. et al. Sorotipos de transporte e isolados invasivos de *Streptococcus pneumoniae* em crianças brasileiras na era das vacinas pneumocócicas. **Clin Microbiol Infect.**, v. 12, n. 1, p. 50-55, 2006.

LEE, C. J.; BANKS, S. D.; LEE, J. P. Virulence, Immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. **Crit. Rev. Microbiol**., v. 18, n. 2, p. 89-114, 1991.

LIPSITCH, M. et al. Are anticapsular antibodies the primary mechanism of protection against invasive pneumococcal disease. **PLoS Med**., v. 2, p. 15, 2005.

LOPEZ, R. et al. The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins. **Microb. Drug Resist.**, v. 3, p. 199–211, 1997.

LU, Y. J. et al. GMP-grade pneumococcal whole-cell vaccine injected subcutaneously protects mice from nasopharyngeal colonization and fatal aspiration-sepsis. **Vaccine**, v. 28, n. 47, p. 7468-7475, 2010.

MACHADO-SEQUEIRA, C. M. Resistência aos antibióticos: o uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. **Rev. OFIL**, v. 14, n. 1, p. 45-68, 2004.

MALLEY, R. et al. Recognition of pneumolysin by toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. **Proc Natl Acad Sci**., v. 100, n. 4, p. 1966-1971, 2003.

MANDELL, L. A. et al. Infectious diseases society of america/american thoracic society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, n. 2, p. 27–72, 2007.

MARTÍNEZ-SERNÁNDEZ, V. Development and evaluation of a new lateral flow immunoassay for serodiagnosis of human fasciolosis. **PLoS Neql. Trop. Dis**., v. 5, n. 11, p. 61376, 2011.

McCULLERS, J. A; TUOMANEN, E. I. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. **Front Biosci.,** v. 6, p. D877–D889, 2001.

McNEELA, E. A. et al. Pneumolysin activates the NLRP3 infl ammasome and promotes proinfl amatory cytokines independently of TLR4. **PLoS Pathog**., v. 6, n. 11, e1001191, 2010.

MILLIPORE CORPORATION. **Rapid lateral flow test strips: considerations for product development.** 2008. Disponível em: <http://www.millipore.com/techpublications/tech1/tb500en00> Acesso em: 20 set. 2010.

MERCK Millipore Corporation. Disponível em: https://www.millipore.com/diagnostics_cap/flx4/estapor_lateral_flow&tab1=1&tab2=3#tab2=3:tab1=1> Acesso em: 10 dez. 2013.

MITCHELL, M.; MITCHELL, T. J. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, p. 411–418, 2010.

MOFFITT K. L.; MALLEY R. Next generation pneumococcal vaccines. **Curr. Opin. Immunol**., v. 23, p. 407–413, 2011.

MUNDY, L. M. et al. Community-acquired pneumonia: impact of immune status**. Am J Respir Crit Care Med**., v. 152, p. 1309-1315, 1995.

MURDOCH, D. R.; LAING, R. T. R.; COOK, J. M. The NOWS-pneumoniae urinary antigen test positivity rate 6 weeks after pneumonia onset and among patients with COPD. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, p. 153–154, 2003.

MURDOCH, D. R.; RELLER, L. B. Immunochromatographic test for rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* in the nasopharynx. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 2271, 2003.

MURDOCH, D. R. et al. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. **J. Clin. Microbiol**., v. 41, p. 63–66, 2003.

MURPHY J.; BUSTIN S. A. Reliability of real-time reverse-transcriptase PCR in clinical diagnostics: gold standard or substandard? **Exp. Rev. Mol. Diagn.**, v. 9, p. 187–197, 2009.

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

MUSHER, D. M. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. **Clin. Infect. Dis**., v. 14, p. 801–804, 1992.

MUSHER, D. M.; MONTOYA, R.; WANAHITA, A. Diagnostic value of microscopic examination of gram-stained sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia**. Clin. Infect. Dis.**, v. 39, p. 165–169, 2004.

MCGEE, L. et al**.** Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network**. J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2565–2571, 2001.

NATARAJU, B. et al. Colloidal textile dye-based dipstick immunoassay for the detection of nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) of silkworm, bombyx mori L. **Nal. Invertebrate Pathol.**, v. 63, p. 135-139, 1993.

NELSON, A. L. et al. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucusmediated clearance. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 83–90, 2007.

NGOM, B.; GUO, Y.; WANG, X.; BI, D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. **Anal. Bioanal. Chem**., v. 397, n. 3, p. 1131-1135, 2010.

NUNES, A. A. et al. Antigen detection for the diagnosis of pneumonia**. Pediatr. Pulmonol.,** v. 38, p. 135–139, 2004.

NORDE, W. Adsorption of proteins from solution at the solid–liquid interface. **Adv. Colloid. Interface Sci**., v. 4, p. 267–340, 1986.

O'BRIEN, K. L et al. Immunologic priming of young children by pneumococcal glycoprotein conjugate, but not polysaccharide, vaccines. **Pediatr. Infect. Dis J.,** v. 15, n. 5, p. 425–430, 1996.

O'BRIEN, K. L.; SANTOSHAM, M. Potential impact of conjugate pneumococcal vaccines on pediatric pneumococcal diseases. **Am. J. Epidemiol**., v. 159, p. 634-644, 2004.

O'FARRELL, B**. Evolution in lateral flow based immunoassay systems.** Humana Press, 2009. p. 1-33. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59745-240-3_1> Acesso em: 10 jan. 2010.

OLIVER, C. **Immunocytochemical methods and protocols**: methods en molecular biology. 3rd ed. New York: Humana Press, 2010. 401 p.

OLIVER-HOYO, M.; GERBER, R. W. From the research bench to the teaching laboratory: Gold nanoparticle layering. **J. Chem. Educ.**, v.84, n. 7, p. 1174-1176, 2007.

PEREZ-DORADO, I.; GALAN-BARTUAL, S.; HERMOSO, J. A. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. **Mol. Oral Microbiol**., v. 27, n. 4, p. 221–245, 2012.

PERKINS, M. D.; MIRRETT, S.; RELLER, L. B. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. **J. Clin. Microbiol**., v. 33, p. 1486–1491, 1995.

PETTI, C. A.; WOODS, C. W.; RELLER, L. B. *Streptococcus pneumoniae* antigen test using positive blood culture bottles as an alternative method to diagnose pneumococcal bacteremia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 2510–2512, 2005.

PLETZ, M. W. et al. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **Int. J. Antimicrob. Ag**., v. 32, n. 3, p. 199-206, 2008.

PUERINI, R. A. **Detection and quantification of *Streptococcus pneumonie* serotypes in the nasopharynx of healthy children in Peru**. Master of Public Health, Epidemiology, Wesleyan University, 2006.

QUACH, C. et al. Clinical aspects and cost of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in children: resistant vs. susceptible strains. **Int J Antimicrob Ag**., v. 20, p. 113-118, 2002.

RAJALAKSHMI, B. et al. Pneumolysin in urine: a rapid antigen detection method to diagnose pneumococcal pneumonia in children. **Ind. J. Med. Microbiol**., v. 20, p. 183–186, 2002.

RAW, I.; MARTINS, E. A. L. **Medicina molecular**. 2. ed. São Paulo. Editora Roca LTDA, 2006.

ROCHA, L. B. **Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos para diagnóstico de Escherichia coli produtora da toxina de Shiga (STEC) e Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC)**. 2012. 178 f. Tese (Doutorado) - Instituto Butantan. Programa Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

RODGERS, G. L.; KLUGMAN, K. P. The future of pneumococcal disease prevention. **Vaccine**, v. 29, p. C43–C48, 2011.

RODRIGUES, J. C. et al. Diagnóstico etiológico das pneumonias - uma visão crítica. **J. Pediatr**., v. 78, p. S129-S140, 2002. Suppl. 2.

RUBINS, J. B.; JANOFF, E. N. Pneumolysin: A multifunctional pneumococcal - virulence factor. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 131, n. 1, p. 21-27, 1998.

RUDOLPH, K. M. et al. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. **J. Clin. Microbiol**., v. 31, p. 2661–2666, 1993.

RUIZ-GONZÁLEZ, A. et al. Is *Streptococcus pneumoniae* the leading cause of pneumonia of unknown etiology? A microbiologic study of lung aspirates in consecutive patients with community-acquired pneumonia. **Am. J. Med.,** v. 106, p. 385-390, 1999.

SCOTT, J. A. et al. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 973-981. 1996.

SIMELL, B. et al. Pneumococcal carriage and otitis media induce salivary antibodies to pneumococcal surface adhesin a, pneumolysin, and pneumococcal surface protein a in children. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 887–896, 2001.

SORENSEN, U. B.; HENRICHSEN, J. Cross-reactions between pneumococci and other streptococci due to C-polysaccharide and F antigen. **J. Clin. Microbiol**., v. 25, n. 10, p. 1854-1859, 1987.

SPREER, A. et al. Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. **Antimicrob. Agents Chemother**., v. 47, n. 8, p. 2649-2654, 2003.

SUCHER, A. J.; CHAHINE, E. B.; NELSON, M.; BRANDON, J. S. Prevnar 13, the New 13-Valent pneumococcal conjugate vaccine. **Ann. Pharmacother.**, v. 45, n. 12, p. 1516-1524, 2011.

SCHUCHAT, A. et al. Active bacterial core surveillance of the emerging infections program network**.** **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, 2001.

SNOWDEN, K.; HOMMEL, M. Antigen detection immuno-14. assay using dipstick and colloidal dyes. **J. Immunol. Methods**, v. 140, p. 57-65, 1991

TAI, S. S. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. **Crit. Rev. Microbiol.,** v. 32, p. 139–153, 2006.

TU, A-HT. et al. Pneumococcal surface protein A (PspA) inhibits complement activation by *Strepococcus pneumoniae*. **Infect Immun.**, v. 67, p. 4517-4524, 1999.

VARVIO, S. L. et al. Evolution of the capsular regulatory genes in *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v. 200, n. 7, p. 1144-1151, 2009.

WALL, E. C. et al. Persistence of pneumolysin in the cerebrospinal fluid of patients with pneumococcal meningitis is associated with mortality. **Clin. Infect. Dis**., v. 54, n. 5, p. 701–705, 2012.

WANG, S-J. et al. Development of a disperse dye immunochromatographic test for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 125, n. 3-4, p. 284-290, 2008.

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?** Uso racional de medicamentos: temas selecionados. v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

WERNO, A. M.; MURDOCH, D. R. Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 6, p. 926-932, 2008.

WHEELER, J. et al. Detection of pneumolysin in sputum. **J. Med. Microbiol**., v. 48, p. 863-866, 1999.

WIRIYACHAIPORN, S. et al. Evaluation of a rapid lateral flow immunoassay for *Staphylococcus aureus* detection in respiratory samples. **Diagn. Microbiol. Infect Dis.**, v.75, n.1, p. 28-36, 2012.

WONG, R.C.; TSE, H.Y. **Lateral flow immunoassay**. New York: Humana Press. 2009. 236 p. doi: 10.1007/978-1-59745-240-3_1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization Report on Infectious Diseases 2000 – Overcoming antimicrobial resistance**. Publication Code: WHO/CDS/2000.2. Disponível on-line: <http://www.who.int/infectious-diseasereport/2000> - Acesso em: 10 jan. 2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization - WHO position paper. **Wkly Epidemiol. Rec**., v. 82, p. 93–104, 2007.

YAN, Z. et al. Rapid quantitative detection of Yersinia pestis by lateral-flow immunoassay and up-converting phosphor technology-based biosensor. **Sensor Actuat**., v. 119, n. 2, p. 656-663, 2006.

YOTHER, J.; WHITE, J. M. Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein pspA. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 10, p. 2976-2985, 1994.

YU, V. L. et al. Evaluation of the Binax urinary, gram stain and sputum culture for *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired pneumonia [abstract 262]. In: Program and abstracts of the 38th **Annual Meeting of the Infectious Disease Society of America.** New Orleans, 2000.