

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

**ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PNEUMOLISINA E ANTI- PspA DE
PNEUMOCOCO COMO MARCADORES EM TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO
RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE***

STEFANI DAVINI

São Paulo
2019

STEFANI DAVINI

**ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PNEUMOLISINA E ANTI- PspA DE
PNEUMOCOCO COMO MARCADORES EM TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO
RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE***

Monografia de Conclusão do Curso de
Especialização Biotecnologia para a
Saúde – Vacinas e Biofármacos do
Instituto Butantan, sob orientação de Prof.
Dr^a Waldely de Oliveira Dias.

São Paulo

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Davini, Stefani

Anticorpos monoclonais Anti-Pneumolisina e Anti-PspA de pneumococo como marcadores em teste imunocromatográfico rápido para detecção de *Streptococcus pneumoniae*. / Stefani Davini; orientador Waldely de Oliveira Dias – São Paulo, 2019.

30 p.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos.

1. Assunto. I. Dias, Waldely de Oliveira. III. Instituto Butantan. IV. Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno a partir de modelo desenvolvido pela
Biblioteca do Instituto Butantan

Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
"Dr. Antônio Guilherme de Souza"
Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Stefani Davini, aluno(a) do curso de Especialização Biotecnologia para saúde - Vacinas e Biofármacos, do Instituto Butantan, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 25 de Fevereiro de 2019

Stefani Davini
aluno(a)

PP Elizabeth A. M. T.
De acordo:.....
Orientador(a):

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é um importante patógeno humano, causador de doenças pneumocócicas invasivas que incluem pneumonia, meningite e bacteremia. Responsável por alta taxa de morbimortalidade infantil, sobretudo em países em desenvolvimento. O diagnóstico rápido é importante para condução de tratamento adequado. Testes imunocromatográficos baseados em tira, ou testes de dipstick são rápidos, baratos, têm boa especificidade, dotados de simples interpretação e realização. Dessa forma, correspondem a ótima alternativa a testes convencionais, principalmente em países em desenvolvimento. Detectam a presença ou ausência de analitos alvos, como antígenos bacterianos. Neste estudo, foram avaliados anticorpos monoclonais e métodos de conjugação com dois marcadores coloridos: microesferas coloidais coloridas com grupos carboxila em sua superfície e nanopartículas de ouro coloidal. Os anticorpos monoclonais escolhidos para conjugação foram anti-pneumolisina (Ply) e anti-proteína A de superfície de pneumococo (PspA). Foram utilizados como anticorpos de captura soros policlonais anti-Ply e anti-vacina pneumocócica celular (WCPV). A melhor conjugação foi obtida com nanopartículas de ouro coloidal, com detecção de antígenos bacterianos presentes em amostras bacterianas 10^7 a 10^4 UFC/mL, e em sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V, um dos sorotipos mais prevalentes. Os resultados foram obtidos em 10-20 minutos. O dipstick avaliado pode ser considerado promissora ferramenta de detecção sensível e rápida de antígenos de *S. pneumoniae*.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*; Dipstick; Anticorpos Monoclonais; Marcadores Coloridos.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is an important human pathogen, which causes invasive pneumococcal diseases including pneumonia, meningitis and bloodstream infections. Responsible for high rates of child morbidity and mortality, especially in developing countries. Early diagnosis is important to lead an appropriate treatment. Strip-based immunochromatographic tests, or dipstick tests are fast, cheap, have good specificity, simple interpretation and performance. Thus, they correspond to the great alternative to conventional tests, especially in developing countries. This kind of test intends to detect the presence or absence of target analytes, such as bacterial antigens. In this study, monoclonal antibodies and conjugation methods were evaluated with two colored markers: dyed colloidal microspheres with carboxyl groups on their surface and colloidal gold nanoparticles. Monoclonal antibodies chose for conjugation were anti-pneumolysin (Ply) and anti-pneumococcus surface protein A (PspA). Anti-Ply polyclonal sera and anti-whole cell pneumococcal vaccine (WCPV) were used as capture antibodies. The best results were obtained with colloidal gold nanoparticles, in which bacterial antigens were detected in bacterial 10^7 a 10^4 CFU/mL samples and culture supernatant of *S. pneumoniae* serotype 9V, one of the most prevalent serotypes. The results were obtained between 10-20 minutes. The assessed dipstick can be considered as a promising sensitive and fast detection tool for antigens of *S. pneumoniae*

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; Dipstick; Monoclonal antibodies; Colored Markers.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	8
2.OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos Específicos.....	11
3.MÉTODOS	11
3.1 Princípio do teste imunocromatográfico (Dipstick)	11
3.2 Avaliação de anticorpos monoclonais contra Ply e PspA	13
3.3 Cultivo, inativação e lise de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
3.4 Conjugação a Microesferas Coloidas Coloridas Estapor®	14
3.5 Conjugação com nanopartículas de ouro coloidal	15
3.6 Preparação da suspensão de ouro coloidal.....	15
3.7 Preparação dos anticorpos de detecção conjugados às Nanopartículas de Ouro Coloidal.....	16
3.8 Liofilização dos Conjugados	16
3.9 Bloqueio da Porção da Amostra	17
3.10 Montagem dos Dipsticks e corrida do teste	17
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 Avaliação das Amostras de Anticorpos Monoclonais contra antígenos Ply, PspA 1, PspA 3 e WCPV	19
4.2 Dipstick utilizando anticorpos Monoclonais Conjugados a Microesferas Coloidais Coloridas Estapor.....	20
4.3 Dipstick utilizando anticorpos Monoclonais conjugados a Nanopartículas de Ouro Coloidal.....	22
5.CONCLUSÕES	26
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1.INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae, também denominado pneumococo, é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, catalase negativa, fermentadora de carboidratos, que apresenta morfologia celular de cocos esféricos ou lanceolados podendo se dispor aos pares ou em cadeias curtas. Corresponde a um microrganismo fastidioso que requer meios de cultura enriquecidos com sangue de carneiro ou cavalo para cultivo adequado (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; TEIXEIRA et. al, 2015).

A bactéria se fixa às células epiteliais da nasofaringe podendo colonizá-la de forma assintomática, ou se espalhar para outros órgãos como ouvido, sinus e penetrar a barreira das mucosas, atingir a corrente sanguínea e/ou atravessar a barreira hematoencefálica. A transmissão ocorre de forma direta via aerossóis, e a colonização nasofaríngea corresponde a um pré-requisito do desenvolvimento de infecção (HENRIQUES-NOMARK; TOUMANEN, 2013). As doenças pneumocócicas incluem infecções leves como otite média e sinusite, além de infecções severas, classificadas como doenças pneumocócicas invasivas, destacando-se pneumonia, meningite e septicemia (WHO, 2014). Os grupos de risco para infecções severas correspondem a indivíduos imunocomprometidos, idosos e crianças menores de 2 anos. As doenças pneumocócicas são causas frequentes de morbimortalidade globais, sobretudo em países em desenvolvimento (WHO, 2014; CDC, 2017).

O *Streptococcus pneumoniae* é, portanto, um dos agentes etiológicos mais comuns em infecções bacterianas do trato respiratório adquiridas na comunidade (DULLIUS; ZANI; CHATKIN, 2018). Um aspecto importante da epidemiologia da colonização corresponde a ocorrência frequente de co-infecções com múltiplos patógenos, inclusive virais, o que potencializa o agravamento da doença, além de dificultar diagnóstico etiológico e tratamento adequados. A pneumonia pneumocócica persiste como a maior causa de morte em crianças fora do período neonatal, sendo responsável por aproximadamente 900.000 mortes de crianças em 2013 (ROUX; ZAR, 2017). Em 2015, estima-se que ocorreram cerca de 30.000 casos de doença pneumocócica invasiva, dos quais em 30% os pneumococos eram resistentes a um ou mais antibióticos. Doenças pneumocócicas causadas por pneumococos

resistentes a antibióticos elevam os custos comparado a infecções causadas por pneumococos não resistentes (CDC, 2018).

S. pneumoniae apresenta vários fatores de virulência que desempenham importante papel na colonização, transmissão e danos a tecidos, entre os quais destacam-se a cápsula polissacarídica, parede celular, citotoxina intracelular, pneumolisina (Ply), neuraminidases, e proteínas como a proteína A de superfície (PspA) (KILIAN et. al, 2008; WAGNER-MUÑIZ et. al, 2018). A cápsula apresenta diversidade antigênica que permite a diferenciação e identificação de diferentes sorotipos através de reações antissoro específicas (MITCHELL; MITCHELL, 2010; TEIXEIRA et. al, 2015). Existem mais de 90 sorotipos de pneumococos identificados os quais apresentam distribuição variável de acordo com faixa etária, sintomatologia clínica, região geográfica e período de estudo (VIEIRA et. al, 2007). Dos que causam doenças severas, destacam-se no Brasil, os sorotipos 1, 3, 5, 6B, 9V, 12F, 14, 19A, 19F e 23F (VIEIRA et. al, 2007; YOSHIOKA et. al, 2011; DULLIUS; ZANI; CHATKIN, 2018).

A grande diversidade de sorotipos representa um importante desafio no desenvolvimento de estratégias de controle desse patógeno de distribuição global (MELLORS et. al, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a inclusão de vacinas pneumocócicas em programas de imunização infantil (WHO, 2014). Dentre as vacinas disponíveis destacam-se a vacina conjugada pneumocócica 13-valente (VCP13) e a vacina pneumocócica polissacarídica 23-valente (VPP23). A capacidade de imunização da vacina polissacarídica baseia-se no antígeno da cápsula polissacarídica, o que não é suficiente para gerar uma resposta T dependente, diferentemente do que ocorre com a vacina conjugada cujos polissacarídeos estão conjugados a proteínas transportadoras sendo, portanto, associada a uma proteção mais eficiente contra a doença (DULLIUS; ZANI;CHATKIN, 2018).

Avanços no desenvolvimento de vacinas melhoradas, altas taxas de coberturas vacinais, melhoras no tratamento, têm gerado diminuições substanciais nas taxas de mortalidade causadas por doenças pneumocócicas. Entretanto, muitos países e regiões apresentam carência de acesso desse tipo de intervenção, sobretudo países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (ROUX; ZAR, 2017). Limitações em diagnóstico convencional existentes, além de dificultar tratamento adequado, evitando complicações clínicas e de resistência bacteriana, também impactam na

capacidade de obtenção de dados epidemiológicos, bem como na avaliação da efetividade de medidas profiláticas. Sugere-se que a maioria dos casos de pneumonia de etiologia desconhecida podem ser atribuídos a infecção causada por pneumococos. Há uma necessidade urgente da melhora de diagnóstico, principalmente testes adequados para países em desenvolvimento, onde há maior impacto causado por doenças pneumocócicas (WERNO; MURDOCH, 2008).

Ao contrário de outros testes, o ensaio de fluxo lateral corresponde a um teste que apresenta todos os critérios de métodos diagnósticos adequados a recursos limitados definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) os quais incluem acessibilidade, sensibilidade, especificidade, não requerem infra-estrutura laboratorial e mão de obra especializada, portabilidade, resultados rápidos e robustos. Além disso, não necessitam de grandes quantidades de amostra clínica, podem ser armazenados por longos períodos de tempo e não precisam ser mantidos sob refrigeração, sendo, portanto, ideais para países em desenvolvimento (VIDAL; BOULWARE, 2015; WHO, 2017). Os ensaios de fluxo lateral são plataformas baseadas em tiras, também chamados de dipsticks, que se fundamentam em procedimentos imunocromatográficos utilizando propriedades de ligação antígeno-anticorpo para a detecção de analitos específicos presentes em amostras colocadas no dispositivo do teste, permitindo a exibição rápida de resultados extremamente fáceis de interpretar em apenas alguns minutos. Diversas amostras clínicas de fluidos podem ser utilizadas como saliva, urina, suor, soro, plasma e sangue. Os testes de dipstick, são bons candidatos a testes diagnósticos, além de serem baratos, fáceis de utilizar e largamente aceitáveis por usuários e autoridades regulatórias (CHIAO et. al, 2008; KOCZULA; GALLOTA, 2016). O ensaio pode ser por competição ou indireto, no caso em que o analito é composto por moléculas pequenas que apresentam apenas um determinante antigênico; ou do tipo direto, se apresentar analitos grandes com inúmeros sítios de ligação, como é o caso da gonadotrofina coriônica humana (HCG) utilizada como alvo em testes de gravidez, teste de dipstick mais comumente utilizado (KOCZULA; GALLOTA, 2016).

2.OBJETIVOS

O presente trabalho visou continuar uma linha de pesquisa do laboratório para o desenvolvimento de um ensaio imunocromatográfico rápido para a detecção de *Streptococcus pneumoniae*, como potencial alternativa aos métodos convencionais.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliação de anticorpos monoclonais anti-pneumolisina recombinante :H1-42, B19-2, E-18-7, F8-8; e anti-proteína A de superfície de pneumococo: A7-72, G15-85, H8-76, J7-6, J8-13 por teste de imunoabsorção enzimática (ELISA), para determinar qual anticorpo seria melhor candidato para conjugação a marcadores coloridos contra os respectivos antígenos em testes de dipstick.

Os dipsticks confeccionados também foram avaliados quanto a métodos de conjugação com dois tipos distintos de marcadores coloridos: microesferas coloidais tratadas com grupos carboxila e nanopartículas de ouro coloidal.

3.MÉTODOS

3.1 Princípio do teste imunocromatográfico (Dipstick)

O princípio do teste é simples e se baseia na movimentação, em fluxo unidirecional contínuo mantido por capilaridade, de uma amostra clínica fluida sujeita a conter o analito de interesse suspenso em solução, através de componentes presentes em tiras poliméricas do dispositivo (Figura 1), nas quais moléculas que podem interagir com o analito estão fixadas (CNOPS et. al, 2011; KOCZULA; GALLOTA, 2016; KUSWANDI; GANI; AHMAD, 2017).

A amostra é aplicada na porção da amostra, correspondendo comumente a uma membrana de celulose, em soluções tampão, visando diminuição de ligações inespecíficas com o sistema de detecção. Assim, a amostra migra em direção à porção do conjugado, constituída por membrana de fibra de vidro que contém os chamados anticorpos de detecção, específicos para interação com os analitos alvo, conjugados a partículas coloridas. Quando há a presença do analito, há formação de um imunocomplexo que segue em direção a uma membrana porosa, geralmente de

nitrocelulose, que apresenta anticorpos imobilizados em linhas teste e controle. Anticorpos de captura encontram-se imobilizados na linha teste e interagem com o imunocomplexo formado pelo anticorpo de detecção e analito marcado, indicando um reconhecimento apropriado do analito presente na amostra. Imunoglobulinas totais que interagem com excesso dos anticorpos de detecção, que não interagiram com o analito mas que também migram pela membrana, estão fixadas na linha controle e indicam que a amostra fluiu apropriadamente (CNOPS et. al, 2011; KOCZULA; GALLOTA, 2016; KUSWANDI; GANI; AHMAD, 2017).

Dessa forma, a interpretação dos resultados é bem simplificada e se baseia na verificação da presença de linhas formadas no dipstick, sendo que linhas teste e controle indicam um resultado positivo para a presença do analito em questão presente na amostra; a formação unicamente da linha controle indica um resultado negativo; e caso haja a formação da linha teste mas não do controle ou ausência de linhas, o resultado é considerado inválido, sendo recomendado repetir o teste (CNOPS et. al, 2011; KOCZULA; GALLOTA, 2016; KUSWANDI; GANI; AHMAD, 2017).

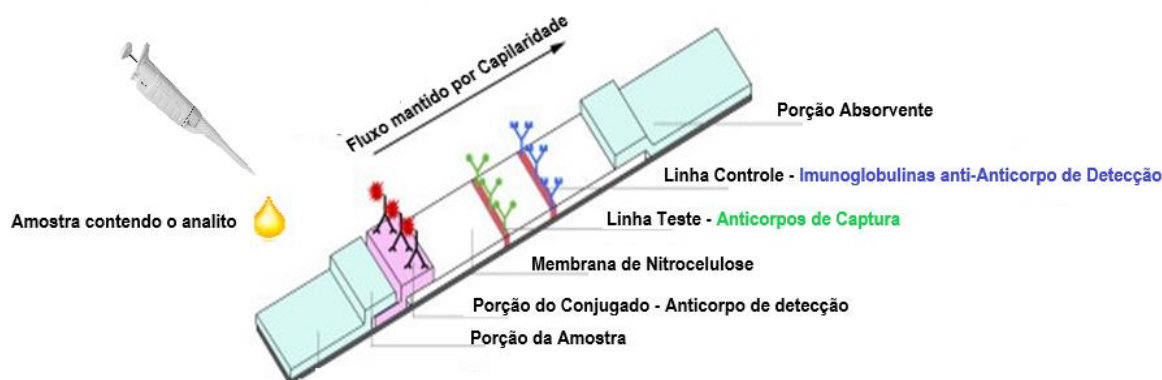


FIGURA 1. Componentes do Teste Dipstick – Adaptado de CNOPS, 2011.

3.2 Avaliação de anticorpos monoclonais contra Ply e PspA

Foi avaliada por ensaio ELISA uma bateria de anticorpos Monoclonais (AcMo): Anti-pneumolisina recombinante (anti-Ply) - H1-42, B19-2, E18-3, F8-8, D9-48; e Anti-Proteína A de superfície de pneumococo (Anti-PspA) - A7-72, G15-85, H8-76, J7-6, J8-13, contra pneumolisina recombinante (Ply), Proteína A de superfície de pneumococo tipo 1 (PspA 1), tipo 3 (PspA 3) ou Vacina Pneumocócica Celular (WCPV). Esses anticorpos foram gentilmente cedidos pela Dra Farida Nato (Institut Pasteur Paris – Plate-Forme 5,) e armazenados a -4°C até o uso.

Placas de microtitulação de poliestireno (Costar® 3590 da Corning) foram sensibilizadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de Ply, PspA1, PspA3, ou WCPV a 10^{10} células/mL, em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6 (50 μl por poço). As placas foram incubadas a 4°C overnight, e a seguir por 30 min, a 37°C . Após o período de incubação, as placas foram submetidas a três lavagens sucessivas com tampão Na_2HPO_4 dibásico/ KH_2PO_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 de anticorpos monoclonais em diluições seriadas em tampão fosfato salina (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: 5000 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 2,0 mg de OPD (o-phenilediamina dihidroclorato – OPD) em 40 mL de tampão citrato fosfato pH 5 (citrato de sódio 0,1 M/fosfato de sódio monobásico 0,2 M) e 20 μl H_2O_2 . Após 20 minutos de incubação no escuro, a temperatura ambiente, as reações foram interrompidas pela adição de 30 μl de H_2SO_4 4M. 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.

3.3 Cultivo, inativação e lise de *Streptococcus pneumoniae*

A amostra de cepa trabalho contendo o sorotipo 9V foi descongelada, semeada e isolada por técnica de esgotamento em placa de meio ágar infusão de cérebro e coração (BHI) enriquecida com 5% de sangue de cavalo. A placa foi incubada em anaerobiose, a 36°C, por 48 horas. Após o crescimento, foi realizada coloração de Gram para atestar a pureza dos cultivos. Feito isso, colônias isoladas foram repicadas em 40 mL de meio líquido Todd-Hewitt (THY) e incubadas em anaerobiose, a 36°C, por 48 horas. As bactérias foram inativadas acrescentando-se ao cultivo formaldeído 2% e a seguir centrifugadas (10000 rpm, a 4°C, 10 min). O precipitado ressuspensa em PBS e o sobrenadante guardado para avaliação nos testes. Ambos foram estocados em tubos falcon de 50 mL e mantidos a -4°C até o uso.

Os testes também foram avaliados com soluções de células bacterianas lisadas. Para a lise da bactéria, foram reservados 1 mL de cada concentrado bacteriano os quais foram centrifugados (10000 rpm, a 4°C, 10 min), os sobrenadantes desprezados e os precipitados ressuspensos em 1 mL do tampão de lise contendo lizozima (800 µg/mL). As soluções foram homogeneizadas em vortex, por 1 minuto e posteriormente estocadas a 4°C por 40 minutos para deixar a lizozima agir. As soluções foram diluídas em 2 mL de PBS antes de serem aplicadas nos testes.

3.4 Conjugação a Microesferas Coloidais Coloridas Estapor®

As microesferas coloidais utilizadas são produto registrado da Estapor® (Merck, Damstadt, Alemanha), e possuem características físico químicas estabelecidas garantindo a validação do teste. A uniformidade das microesferas oferece uma melhor estabilização do imunocomplexo anticorpo/microesfera. As microesferas utilizadas neste trabalho (Black WO K1-050) apresentam adição de grupos funcionais carboxila em suas superfícies.

Os AcMo Anti-Ply (E18-7) e Anti-PspA (J8-13) foram utilizadas como anticorpos dedetecção conjugados às microesferas, na concentração final de 1mg/mL em tampões de adsorção Borato pH 8,5, 0,1 M e Salina Tamponada com Fosfato (PBS), pH 7,4. O pH foi ajustado para 8,5 e, em seguida, as microesferas foram adicionadas diretamente a essa solução de anticorpos, na proporção de 1%. As

soluções foram mantidas overnight a 4°C sob agitação lenta, visando a adsorção dos anticorpos às microesferas. As soluções foram centrifugadas a 498 rpm, por 30 minutos, a 4°C. Os precipitados foram ressuspensos em tampões de bloqueio: PBS pH 7,4, 0,5% Triton, 1% Caseína e Borato (0,1M) pH 8,5, 0,5 % Triton, 1% Caseína. As soluções foram transferidas para membranas de fibra de vidro, incubadas a -80°C por 30 min e posteriormente liofilizadas.

Foram também avaliados os AcMo anti-Ply (E18-7) e anti-PspA (J8-13) como anticorpos de detecção conjugados às microesferas, na concentração final de 1mg/mL em tampões de adsorção Borato pH 8,5, 0,1M e Carbonato Bicarbonato 0,1M, pH 9,2. O pH foi ajustado para 8,5, e em seguida as microesferas foram adicionadas a essa solução, a 2%. As soluções foram mantidas overnight a 4°C sob agitação lenta, e posteriormente a solução (800µL) foi centrifugada a 498 rpm, por 30 minutos, a 4°C. Os precipitados foram ressuspensos em tampões de bloqueio: Borato (0,1M) pH 8,5, 0,5% Triton, 1% Caseína; Carbonato Bicarbonato 0,1M, pH 9,2, 0,5% Triton, 1% Caseína. As soluções foram transferidas para membranas de fibra de vidro, que foram incubadas a -80°C por 30 min e posteriormente liofilizadas overnight.

3.5 Conjugação com Nanopartículas de Ouro Coloidal

Os anticorpos monoclonais Anti-Ply (E18-7) e Anti-PspA (J8-13) foram conjugados a Nanopartículas de Ouro Coloidal (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA ou BBIInternational, Cardiff, Inglaterra) de acordo com o protocolo de Oliver (2010) e Rocha (2012).

3.6 Preparação da suspensão de ouro coloidal

Uma suspensão de ouro coloidal a 0,01% (partículas de 20 nm de diâmetro), foi ajustada para pH 9,0 com carbonato de potássio 0,1 M (K₂CO₃).

3.7 Preparação dos anticorpos de detecção conjugados a Nanopartículas de Ouro Coloidal

Os AcMo anti-Ply (E18-7) ou anti-PspA (J8-13) foram diluídos em 0,5 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 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 correspondeu à 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.

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 -80°C, por 30 minutos, e posteriormente liofilizados.

3.8 Liofilização dos Conjugados

Os anticorpos conjugados com as diferentes partículas coloidais (ouro coloidal ou microesferas Estapor®) foram aplicados em volume de 500 µl sobre membrana de

fibra de vidro, liofilizados por 24 horas e mantidos em estufa a 28°C até serem utilizados nos dipsticks.

3.9 Bloqueio da Porção da Amostra

A fim de diminuir interações inespecíficas entre o anticorpos de captura e conjugado na linha teste do Disptick, diferentes tampões de bloqueio foram avaliados para pré-tratamento dos filtros de celulose da Porção da Amostra: Borato (10mM) pH8,5, 0,5% Triton, 1% Caseína; Fosfato Salina (PBS), pH 7,4, 0,5% Triton, 1% caseína; Carbonato Bicarbonato, pH 9,96, 0,5% Triton, 1% Caseína em testes realizados com anticorpos conjugados a Microesferas Estapor® e Borato (10mM) pH8,5, 0,5% Triton em testes utilizando ouro coloidal.

Papéis de filtro nas dimensões de 2,0 x 10 cm, foram embebidos em tampões de bloqueio, dispostos em suporte de vidro e mantidos em estufa a 28°C, por 24 horas. Assim, as membranas tratadas foram secas e armazenadas em estufa a 28°C, envoltas em papel alumínio até o uso.

3.10 Montagem dos Dipsticks e corrida do teste

As imunoglobulinas produzidas em camundongos (Ig) utilizadas como anticorpos de captura nos Dispticks foram anteriormente produzidas em nosso laboratório e armazenadas a -4C°.

Esses anticorpos foram aplicados na linha teste na Membrana de Nitrocelulose (MN) em PBS 0,01M, pH 7,4, em uma área de 2,5 x 0,5 cm: Anti-Ply [4,9mg/mL]; Anti-WCPV [4,6mg/mL] em testes com anticorpos conjugados a nanopartículas de ouro coloidal; Anti-Ply [1mg/mL] ou Anti-WCPV [1mg/mL] em testes com anticorpos conjugados a microesferas coloidais.

Na linha controle foi aplicada IgG total de cabra anti-camundongo (Sigma-Aldrich®) em PBS 0,01M, pH 7,4, na concentração de 1mg/mL em testes utilizando nanopartículas de ouro; e 0,5 mg/mL em testes com as microesferas.

O dipstick foi montado fixando-se adequadamente com fitas dupla-face o filtro de celulose para a deposição da amostra, sob a membrana da fibra de vidro previamente tratada com o conjugado (anticorpo de detecção/corante) e o filtro

absorvente de celulose (Porção Absorvente) às extremidades da Membrana de Nitrocelulose (MN) (onde os anticorpos das linhas teste e controle já haviam sido depositados).

As amostras utilizadas foram o sobrenadante de cultura em meio THY e amostras de bactéria ressuspensas em PBS tratadas ou não com tampão de lise, tendo como controles negativos o meio THY e PBS, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar da importância global de doenças pneumocócicas, surpreendentemente existem poucos avanços recentes em desenvolvimentos de diagnóstico laboratorial da doença. Ressalta-se a grande dependência de métodos microbiológicos, baseados em cultura e coloração de Gram, que apresentam dificuldades no que se refere à qualidade de obtenção de amostras clínicas do trato respiratório inferior, influência da antibioticoterapia, falhas de descoloração, e a descrição recente da bactéria *S. Pseudopneumoniae*, que apresenta potencial para ser erroneamente identificada como *S. pneumoniae* (KILIAN et. al, 2008; WERNO; MURDOCH, 2008). A reação quellung, pouco utilizada atualmente, corresponde ao método mais específico para detecção de pneumococos em culturas de escarro, entretanto, apresenta alta ocorrência de reações cruzadas com polissacarídeos de outros *Streptococcus*, levando a resultados falso-positivos, além do fato de cepas não encapsuladas poderem produzir resultados falso-negativos. Outros testes comerciais altamente sensíveis como teste de aglutinação, coagulação e hibridização de DNA correspondem a alternativas rápidas para identificação de *S. pneumoniae*, porém, frequentemente produzem resultados falso-positivos (WERNO; MURDOCH, 2008). Testes de detecção de anticorpos nunca foram amplamente utilizados, pois apresentam problemas de baixa sensibilidade e especificidade, bem como longo tempo de realização (WERNO; MURDOCH, 2008). O mesmo ocorre para testes de amplificação de ácidos nucleicos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que também apresentam problema de falta de padronização (LORENTE et. al, 2000; WERNO; MURDOCH, 2008).

O maior avanço diagnóstico recente corresponde ao desenvolvimento de um teste imunocromatográfico rápido que detecta o antígeno polissacarídico C da parede celular de *S. pneumoniae* (Binax NOW). Em amostras de urina, este teste apresenta sensibilidade de 70-80% e especificidade maior que 90%, comparado a métodos convencionais em adultos. Entretanto apresenta alto custo, e sua utilidade no diagnóstico em crianças pequenas tem sido questionada devido à baixa especificidade e alta taxa de resultados falso-positivos relatados em diversos estudos. A vacinação recente também pode produzir resultados falso-positivos. Sugere-se que este teste seja aplicado em conjunto com outros métodos. Outros antígenos pneumocócicos, em particular a Ply, têm sido investigados como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos testes (DOMÍNGUEZ et. al, 2003; SMITH et. al, 2003; ROSÓN et. al, 2004; WERNO; MURDOCH, 2008).

A Ply é uma hemolisina produzida por todas as amostras clínicas de *S. pneumoniae*. Outro potencial alvo é a PspA, uma proteína que faz parte do grupo de proteínas ligadas a colina, expressa por todos os sorotipos de maior importância clínica (CARVALHO; CABRERA-CRESPO; TANIZAKI; GONÇALVES, 2012; TEIXEIRA et. al, 2015).

Assim, a escolha adequada de melhores determinantes antigênicos, anticorpos específicos, tratamento adequado das membranas que compõem o dispositivo, e conjugação a marcadores coloridos desempenham um importante papel na determinação da sensibilidade do ensaio imunocromatográfico (SAJID; KAWDE; DAUD, 2015).

Neste trabalho foi realizada a avaliação de um teste imunocromatográfico do tipo competitivo através da seleção de anticorpos monoclonais anti-Ply e Anti-PspA conjugados a dois tipos de marcadores: microesferas coloidais coloridas Estapor® e nanopartículas de ouro coloidal.

4.1 Avaliação de Anticorpos Monoclonais contra Ply, PspA 1, PspA 3 e WCPV

AcMo anti-Ply e anti-PspA foram avaliados por ELISA (item 3.2 de Métodos) contra os antígenos Ply, WCPV, PspA1 e PspA3. Conforme indicado na TABELA 1, todos os AcMo anti-PspA apresentaram boa reatividade contra os antígenos de WCPV e

PspA3, porém não houve reatividade contra PspA1. O AcMo J8-13 apresentou os maiores títulos contra PspA3 e WCPV, e foi posteriormente utilizado como anticorpo de detecção. O AcMo E18-7 apresentou os títulos mais elevados contra antígenos Ply e WCPV (TABELA 2), sendo escolhido para ser testado em dipsticks como anticorpo de detecção conjugado a microesferas Estapor e a nanopartículas de ouro coloidal.

TABELA 1. Títulos dos diferentes AcMo Anti-PspA contra PspA1,3 e WCPV

Coating	AcMo Anti - PspA				
	A7-72	G15-85	H876	J7-6	J813
PspA1	0	0	0	0	0
PspA3	25600	12800	51200	51200	51200
WCPV	1280	640	1280	1280	5120

TABELA 2. Títulos dos diferentes AcMo Anti-Ply contra Ply e WCPV

Coating	AcMo Anti - Ply				
	H1-42	B19-2	E18-7	F8-8	D9-48
Ply	40	20	5120	60	1280
WCPV	320	640	5120	1280	2560

4.2 Dipstick utilizando anticorpos Monoclonais Conjugados a Microesferas Coloidais Coloridas Estapor®

As microesferas Estapor® são uniformes e coradas internamente, evitando alterações em sua superfície. As utilizadas neste trabalho (Black WO K1-050)

apresentam a adição de grupos carboxila em sua superfície, visando a formação de uma ligação covalente forte entre o anticorpo e a partícula, por meio da formação de um grupo funcional que estabilize essa ligação, resultante da interação entre a carboxila da microesfera e grupos amino terminais da glicoproteína do anticorpo, tornando a conjugação mais eficiente (GOMES; FERREIRA, 2008; MERCK, 2018). Tendo isso em vista, a princípio a conjugação foi realizada (conforme item 3.4 de Métodos) utilizando-se os AcMo Anti-Ply (E18-7) e Anti-PspA (J8-13) como anticorpos de detecção na concentração final de 1mg/mL em tampões de adsorção: Borato e PBS, numa concentração de 1% de microesferas. As membranas aparentavam coloração acinzentada muito clara e a mobilidade do anticorpo conjugado, pelos poros da membrana de nitrocelulose pareceu afetada, não ascendendo de forma eficiente, formando agregados na base da Membrana de Nitrocelulose (FIGURA 2 - i), sendo realizadas novas conjugações em concentração de 2% de microesferas com os AcMo anti-Ply E18-7 e anti-PspA J8-13 na concentração final de 1mg/mL em tampões de adsorção: Borato e Carbonato Bicarbonato. As membranas também foram tratadas com e sem soluções de bloqueio, a fim de se avaliar se essas soluções afetavam sua mobilidade. Neste caso, não foi observada formação de linha teste e controle do dipstick, inviabilizando o teste (FIGURA 2 - ii). Os experimentos subsequentes foram realizados com anticorpos conjugados com nanopartículas de ouro coloidal.

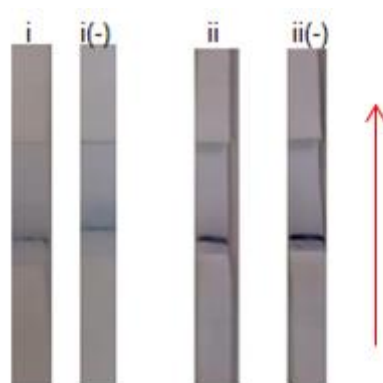


FIGURA 2. Dispticks conjugados a microesferas Estapor® em amostras de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V. (i)Anticorpo Conjugado a 1% de Microesferas: AcMo Anti-Ply (E18-7) [1mg/mL]/ Captura - Ig Anti-Ply [1mg/mL] ; (ii) Anticorpo Conjugado a 2% de Microesferas: AcMo Anti-Ply (E18-7) [1mg/mL] / Captura - Ig Anti-Ply [1mg/mL]. Linha Controle - IgG anti-camundongo [0,5mg/mL]. Controle Negativo: PBS.

4.3 Dipstick utilizando anticorpos Monoclonais conjugados a Nanopartículas de Ouro Coloidal

A aplicação de nanopartículas de ouro coloidal como marcadores coloridos em ensaios imunocromatográficos é muito difundida e amplamente utilizada em diversos estudos (CHIAO et. al, 2008; XIE et. al, 2014; VIDAL; BOULWARE, 2015).

Apresenta vantagens que incluem boa biocompatibilidade, facilidade de conjugação com material biológico e propriedades ópticas que otimizam sua visualização (SINGH; SHARMA; NARA, 2015; SILVA, 2016). O protocolo de conjugação do ouro coloidal com anticorpos de detecção quando comparado ao protocolo de conjugação com as microesferas coloridas, utilizados neste estudo, apresentou vantagens no que se refere a menor tempo de incubação e melhor mobilidade do conjugado pela membrana, não havendo formação de agregados na base do dispositivo. Foi verificada formação de linhas teste e controle, indicando a viabilidade do ensaio.

A superfície da partícula de ouro exibe características eletrostáticas e hidrofóbicas. Para que haja a conjugação de proteínas com esse tipo de partícula, as interações eletrostáticas devem ser reduzidas e as hidrofóbicas devem prevalecer. Para que isso seja possível, ajusta-se o pH da nanopartícula de ouro a aproximadamente 0,5 unidade de pH acima do pI da proteína a ser conjugada, possibilitando a conjugação da proteína ao ouro (JAVOIS, 1994). Neste trabalho, a conjugação dos anticorpos de detecção com nanopartículas de ouro foi realizada de acordo com o protocolo de Oliver (2010). O pH da suspensão de ouro coloidal foi previamente ajustado para pH 9,0 com solução de carbonato de potássio 0,1 M (K_2CO_3).

As nanopartículas de ouro necessitam de quantidade adequada de proteínas para estabilizar em soluções iônicas, o que pode ser determinado visualmente pela cor da solução (ROCHA, 2012).

A fim de determinar a concentração de anticorpos necessária para estabilizar o ouro coloidal, foram realizadas diluições seriadas do anticorpo, adicionadas a alíquotas de 100µl de ouro, como descrito no item 3.7 de Materiais e Métodos. Após incubação de 10 minutos e adição de solução salina a 10%, foi possível determinar a concentração de anticorpos necessária para estabilizar o ouro coloidal, pela alteração da cor da suspensão. Nos tubos em que a concentração de anticorpos foi adequada, a solução permaneceu com cor rosada. A mudança de cor da solução para azul acinzentado é indicativa de concentração insuficiente de anticorpos,

tornando os coloides insaturados e instáveis, precipitando no fundo do tubo. (OLIVER, 2010).

Neste trabalho, as melhores concentrações para a estabilização do ouro coloidal foram 50; 25 e 12,5 para AcMo anti-Ply (E18-7); e 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,5 $\mu\text{g/mL}$ para AcMo anti-PspA (J8-13) (FIGURA 3).

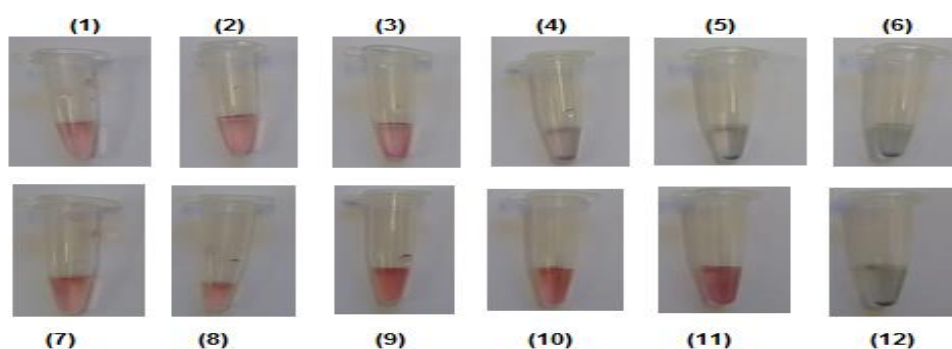


FIGURA 3. Determinação das melhores concentrações de anticorpos para a estabilização do ouro coloidal. 1-6: Diluição seriada de Anti-Ply (E18-7): (1) 50; (2) 25; (3) 12,5; (4) 6,25; (5) 3,15 e (6) 1,56 $\mu\text{g/mL}$. 7-12: Diluição seriada de Anti-PspA (J8-13): (7) 50; (8) 25; (9) 12,5; (10) 6,25; (11) 3,15 e (12) 1,56 $\mu\text{g/mL}$.

4.4 Detecção qualitativa e quantitativa de antígenos de *S. pneumoniae* por testes de Disptick conjugados a Nanopartículas de Ouro Coloidal

Para a análise qualitativa na detecção de antígenos Ply e PspA3, foram confeccionados Dispticks utilizando como marcador colorido nanopartículas de ouro coloidal conjugadas a AcMo Anti-Ply (E18-7) e Anti-PspA (J8-13) em concentrações de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e 3,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os anticorpos de captura utilizados nos testes foram imunoglobulinas de camundongo Anti-Ply com concentração de 4,6 mg/mL e Anti-WCPV com 4,9 mg/mL . Na linha teste do dispositivo foi imobilizada a IgG anti-mouse em concentração de 1 mg/mL .

Um primeiro ensaio foi conduzido utilizando como amostras de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V ressuspenso em PBS. Esse sorotipo foi escolhido por estar entre os principais sorotipos que circulam no Brasil, prevalece em casos de pneumonia e bacteremia pediátricos, e também está associado a resistência a

antibióticos (FREIRE, 2002; DAGAN, 2009; YOSHIOKA et. al, 2011; DULLIUS; ZANI; CHATKIN, 2018) O PBS foi utilizado como controle negativo. O resultado foi obtido em cerca de 20 minutos (Figura 4), com a formação de linha controle em todos os testes, validando o ensaio. Não houve detecção dos antígenos em solução.

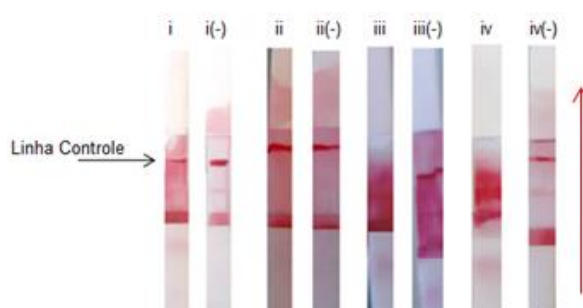


FIGURA 4. Detecção Qualitativa de amostras de cultivo de *S. pneumoniae* (sorotipo 9V). Controle Negativo: PBS. (i) Conjugado - AcMo Anti-Ply (E18-7)[12,5µg/mL]/ Captura - Ig Anti-Ply [4,6 mg/mL]; (ii) Conjugado - AcMo Anti-Ply (E18-7)[12,5µg/mL] / Captura - Ig Anti-WCPV [4,9 mg/mL]; (iii) Conjugado - AcMo Anti-PspA (J8-13) [3,5µg/mL] / Captura - Ig Anti-Ply [4,6 mg/mL] ; (iv) Conjugado - AcMo Anti-PspA (J8-13) [3,5µg/mL] / Captura - IgAnti-WCP [4,9 mg/mL]; Linha Controle - IgG anti-camundongo [1 mg/mL].

Foram realizados ensaios com amostras de sobrenadante de cultivo da bactéria e com amostras de cultivo de *S. pneumoniae* tratadas com tampão de lise (FIGURA 5). Nesses ensaios, os dipsticks confeccionados com AcMo anti-Ply (E18-7) e anti-PspA (J8-13) conjugados a nanopartículas de ouro coloidal foram capazes de detectar antígenos presentes em amostras de cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V quando tratadas com tampão de lise (Figura 5: v-viii), e em sobrenadantes de cultivo (Figura 5 i-iv), sugerindo que fatores inerentes ao dispositivo quanto à escolha e tratamento dos seus componentes, e a própria característica da amostra testada podem influenciar na detecção do antígeno (SAJID; KAWDE; DAUD, 2015).

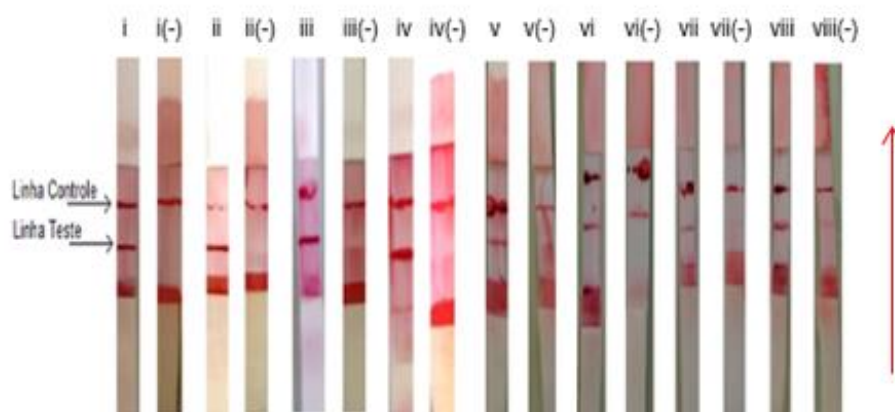


FIGURA 5. Detecção Qualitativa de antígenos presentes em sobrenadante de cultivo de *S. pneumoniae* (sorotipo 9V). Controle Negativo: Meio THY. (i) Conjugado - AcMo Anti-Ply (E18-7)[12,5µg/mL]/ Captura - Ig Anti-Ply [4,6 mg/mL]; (ii) Conjugado - AcMo Anti-Ply (E18-7)[12,5µg/mL] / Captura: Ig Anti-WCPV [4,9 mg/mL]; (iii) Conjugado - AcMo Anti-PspA (J8-13) [3,5µg/mL] / Captura - Ig Anti-Ply [4,6 mg/mL]; (iv) Conjugado - AcMo Anti-PspA (J8-13) [3,5µg/mL] / Captura - Ig Anti-WCP [4,9 mg/mL]; Detecção Qualitativa de antígenos presentes em amostras de *S. pneumoniae* (sorotipo 9V) tratadas. Controle Negativo: PBS. (v) Conjugado - AcMo Anti-Ply (E18-7)[12,5µg/mL]/ Captura - Ig Anti-Ply [4,6 mg/mL]; (vi) Conjugado - AcMo Anti-Ply (E18-7)[12,5µg/mL] / Captura - IgAnti-WCPV [4,9 mg/mL]; (vii) Conjugado - AcMo Anti-PspA (J8-13) [3,5µg/mL] / Captura - IgAnti-Ply [4,6 mg/mL]; (viii) Conjugado - AcMo Anti-PspA (J8-13) [3,5µg/mL] / Captura - Ig Anti-WCP [4,9 mg/mL]. IgG Anti-camundongo [1mg/mL].

A Ply corresponde a uma proteína intracelular liberada pela bactéria, principalmente quando sofre ação de autolisinas (MARTNER et. al, 2008). A PspA é uma proteína que faz parte do grupo de proteínas ligadas a colina, expressa por todos os sorotipos de maior importância clínica, possui importante papel na patogênese de doenças causadas pela bactéria, sobretudo quanto a inibição do sistema complemento do hospedeiro. Essa proteína é classificada em 3 famílias e 6 clados distintos baseado na sequência de alinhamento dos aminoácidos de diferentes cepas de *S. pneumoniae* (MITCHELL; MITCHELL, 2010; CARVALHO; CABRERACRESPO; TANIZAKI; GONÇALVES, 2012).

Quando a amostra de células é tratada com tampão de lise, o rompimento celular libera maior quantidade de Ply, e PspA fica livre em solução, aumentando sua

possibilidade de contato para interação com os AcMo. Esses antígenos também devem ser liberados e ficam em suspensão quando a amostra é centrifugada.

Também foi analisado o limite de detecção do dipstick, em amostras de *S.pneumoniae* tratadas com tampão de lise e ressuspensas em PBS. Para tal a bactéria *S. pneumoniae* sorotipo 9 V foi cultivada, quantificada, tratada com tampão de lise, e ressuspensa em PBS. O dipstick foi capaz de detectar células de *S. pneumoniae* em concentrações de até 10^4 UFC/mL (Figura 6).

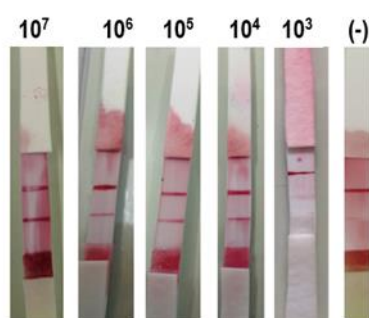


FIGURA 6. Limite de detecção de *S. pneumoniae* por teste de Dipstick. Anticorpo Conjugado - AcMo Anti-PspA (J81-3) [3,5 μ g/mL] / Anticorpo de Captura - Ig Anti-WCPV [4,9 mg/mL]. IgG Anti-camundongo [1mg/mL]. Amostra: cultivo de *S. pneumoniae* sorotipo 9V: 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 UFC/ml em PBS. Controle Negativo PBS.

5.CONCLUSÕES

Os testes de dipstick avaliados neste estudo utilizando anticorpos conjugados a nanopartículas de ouro coloidal como marcadores coloridos apresentaram melhor mobilidade que os testes com anticorpos conjugados a microesferas Estapor®, em que houve formação de aglomerados na base do dipstick.

Os dipsticks conjugados com nanopartículas de ouro coloidal foram capazes de detectar antígenos presentes em amostras da bactéria, em um limite de 10^7 a 10^4 UFC/mL, e em sobrenadante de cultivo de um dos sorotipos mais prevalentes em doenças pneumocócicas invasivas pediátricas. O dipstick avaliado pode ser considerado uma ferramenta promissora para detecção rápida de *S. pneumoniae*. No próximo passo, o dipstick será avaliado em amostras clínicas de urina.

O desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido, sensível, e acessível corresponde a uma importante alternativa aos métodos tradicionais, além de

compreender critérios importantes principalmente para países em desenvolvimento onde há uma maior incidência de casos de doenças pneumocócicas, auxiliando no diagnóstico, e em estudos epidemiológicos e profiláticos do agente etiológico.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALO, R. J.; CABRERA-CRESPO, J.; TANIZAKI, M. M.; GONÇALVES, V. M. Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v.94, p.683-694, 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Pneumococcal Disease**. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pneumococcal/drug-resistance.html>> Acesso em: 25 set. 2018.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Pneumococcal Disease**. 2017. Disponível em:< <https://www.cdc.gov/pneumococcal/index.html>> Acesso em: 18 nov. 2018.

CHIAO, D.; WEY, J.; SHYU, R.; TANG, S. Monoclonal Antibody-Based Lateral Flow Assay for Detection of Botulinum Neurotoxin Type A. **Hybridoma**, v.27, n,1, p.31-35, 2008.

CNOPS, L.; BODERIE, M.; GILLET, P.; ESBROECK, M. V.; JACOBS, J. Rapid diagnostic tests as a source of DNA for *Plasmodium* species-specific real-time PCR. **Malaria Journal**, v. 10, n.67, p.1-11, 2011.

DAGAN, R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Clin. Microbiol. Infect.** v.15, n.3, p.16-20, 2009.

DOMÍNGUEZ, J.; BLANCO, S.; RODRIGO, C.; AZUARA, M.; GALÍ, N.; MAINOU, A.; ESTEVE, A.; CASTELLVÍ, A.; PRAT, C.; MATAS, L.; AUSINA, V. Usefulness of Urinary Antigen Detection by an Immunochromatographic Test for Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia in Children. **Clin. Microbiol.**, v.41, n.5, p. 2161-2163, 2003.

DULLIUS, C. R.; ZANI, L.; CHATKIN, J. M.; Cobertura vacinal pneumocócica teórica: análise de sorotipos isolados de pacientes internados em hospital terciário. **J. Bras. Pneumol.** v.44, n.5, p. 361-366, 2018.

FREIRE, H. B. M. Infecções pneumocócicas: considerações atuais. **Jornal de Pediatria.** v.77, n.1, p.3-5, 2002.

GOMES, F. B. M. B.; FERREIRA, J. P. M. **Seleção e caracterização de mini-anticorpos recombinantes anti-ciprofloxacina.** 2008. 116 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Molecular)-Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal.

HENRIQUES-NOUMARK, B.; TOUMANEN, E. The Pneumococcus: Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.,** v.3, p.1-15, 2013

JAVOIS, L. C. **Immunocytochemical Methods and Protocols.** Totowa, NJ. Humana Press Inc, v. 34, 1994, 451 f.

KILLIAN, M; POULSEN, K.; BLOMQUIST, T.; HAVARSTEIN, L. S.; BEK-THOMSEN, M.; TETTELIN, H.; SORESEN, U. B. S. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close comensal relatives. **PLoS ONE,** v.3, n.7, p.1-10, 2008.

KOCZULA, M.; GALLOTA, A. Lateral flow assays. **Essays in Biochemistry,** v.60, p111-120, 2016.

KUSWANDI, B.; GANI, A. A.; AHMAD, M. Immuno strip test for detection of pork adulteration in cooked meatballs. **Food Bioscience,** v 19, p. 1-6, 2017.

LORENTE, M. L. L.; FALGUERA, M.; NOGUÉS, A.; GONZÁLEZ, A. R.; MERINO, M. T.; CABALLERO, M. R. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by polymerase chain reaction (PCR) in whole blood: a prospective clinical study. **Thorax-**, v. 55, p. 133-137, 2000.

MARTNER; A. DAHLGREN, C.; PATON, J. C.; WOLD, A. E. Pneumolysin Released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. **Infection and Immunity,** v.76, n.9, p.4079-4087, 2008.

MERCK. Dyed Estapor® Microspheres. 2018. Disponível em: <http://www.merckmillipore.com/BR/pt/products/ivd-oemmaterialsreagents/polymeric-microspheres-and-magneticbeads/estapordyedmicrospheres/32Gb.qB.FM8AAAE_ZhV3.Lxj,nav> Acesso em 23 de Dez. 2018.

MELLORS, T. R.; REES, C. A.; FRANCHINA, F. A.; BURKLUND, A.; PATEL, C.; HATHAWAY, L. J.; HILL, J. E. The volatile molecular profiles of seven *Streptococcus pneumoniae* serotypes. **Journal of Chromatography B**.v.1096, p.208-213, 2018.

MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Clinical Microbiology and Infection**, v.16, n.5, p.411-418, 2010.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. In: *Streptococcus*. MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 704-765.

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

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.

ROSÓN, B.; FERNÁNDEZ-SABÉ, N.; CARRATALÀ, J.; VERDAGUER, R.; DORCA, J.; MANRESA, F; GUDIOL, F. Contribution of a Urinary Antigen Assay (Binax NOW) to Early Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia. **CID**, v.38, p.222-226, 2004.

ROUX, D. M.; ZAR, H. J. Community-acquired pneumonia in children – a changing spectrum of disease. **Pediatr. Radiol**. v.47, p. 1392-1398, 2017.

SAJID, M.; KAWDE, A-N; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.19, p.689-705, 2015.

SILVA, A. A. **Síntese e estabilização de nanopartículas de ouro para fins biotecnológicos e cosméticos**. 2016. 93 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia Nuclear)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SMITH, M. D.; DERRINGTON, P.; EVANS, R.; CREEK, M.; MORRIS, R.; DANCE, D. A. B.; CARTWRIGHT K. Rapid Diagnosis of Bacteremic Pneumococcal Infections in Adults by Using the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* Urinary Antigen Test: a Prospective, Controlled Clinical Evaluation. **Journal of Clinic Microbiology**, v.41, n.7, p.2810-2813.

SINGH, J.; SHARMA, S.; NARA, S. Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food and water. **Food Chemistry**, v.170, p.470-483, 2015.

TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C.; CAMPOS, L. C.; PINTO, T. C. A. *Streptococcus pneumoniae*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. Local de publicação: Atheneu, 2015. p.209-215.

VIDAL, J. E.; BOULWARE, D. R. Lateral Flow Assay for Cryptococcal Antigen: An important Advance to Improve the Continuum of HIV Care and Reduce Cryptococcal Meningitis-Related Mortality. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.57, p.38-45, 2015.

VIEIRA, A.C.; GOMES, M. C.; FILHO, M. R.; FILHO, J. E.; BELLO, E. J. M.; FIGUEIREDO, R. B. *Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid. **Jornal de Pediatria**. v.83, n.1, p.71-77, 2007.

XIE, Q. Y.; WU, Y. H.; XIONG, Q. R.; XU, H. Y.; XIONG, Y. H.; LIU, K. L.; JIN, Y.; LAI, W. H. Advantages of fluorescent microspheres compared with gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays. **Biosensors and Bioelectronics**, v.54, p.262-265, 2014.

WAGNER-MUÑIZ, D. A.; HAUGHNEY, S. L.; KELLY, S. M.; WANNEMUEHLER, M. J.; NARASIMHAN. Room Temperature Stable PspA-Based Nanovaccine Induces Protective Immunity. **Frontiers in Immunology**. v.9, n.325, p.1-11, 2018.

WERNO, A. M.; MURDOCH, D. R. Laboratory Diagnosis of Invasive Pneumococcal Disease. **Medical Microbiology**, v. 46, p.926-932, 2008.

WHO, World Health Organization. **A guide to aid the selection of diagnostic tests**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/bulletin/volumes/95/9/16-187468/en/>> Acesso em: 28 de nov. 2018.

WHO. World Health Organization. **Pneumococcal disease**. 2014.

Disponível em: < <http://www.who.int/immunization/diseases/pneumococcal/en/&>>

Acesso em: 27 set. 2018.

YOSHIOKA, C, R. M.; MARTINEZ, M. B.; BRANDILEONE, M. C. C.; RAGAZZI, S. B.; GUERRA, M. L. L. S.; SANTOS, S. R.; SHIEH, H. H.; GILLIO, A. E. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial susceptibility. **Jornal de Pediatria**.v.87,n.1, p.70-75, 2011.

