

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO SUL DE MINAS – UNIS/MG

BIOMEDICINA

FILOMENA CHAVES ALVES

Biblioteca Monsenhor Domingos Prado Fonseca	
N. Class.	613.07
Cutter	A474p
Ano/Ed.	

PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE ANTIESTREPTOLISINA “O”

**Varginha – MG
2009**

FILOMENA CHAVES ALVES

PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE ANTIESTREPTOLISINA “O”

Monografia apresentada ao curso de Biomedicina do Centro Universitário do Sul de Minas – UNIS/MG como pré-requisito para obtenção do grau de bacharel, sob orientação da Prof^ª. Dra. Agda Andrade.

**Varginha – MG
2009**

FILOMENA CHAVES ALVES

PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE ANTIESTREPTOLISINA "O"

Monografia apresentada ao curso de Biomedicina do Centro Universitário do Sul de Minas – UNIS/MG, como pré-requisito para obtenção do grau de bacharel pela Banca Examinadora composta pelos membros:

Aprovado em: 07 / 12 / 2009



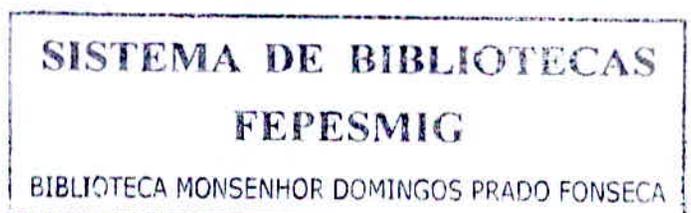
Prof.^a. Dra. Agda Andrade



Prof.^o. Esp. Michele Maiolini

Prof.^o. Ms. Geraldo Majela

OBS.:



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aos meus pais, ao meu esposo e aos meus amigos que contribuíram para a realização dessa pesquisa. Muito obrigada.

“Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro, promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior”.

Dalai Lama

RESUMO

Streptococcus pyogenes é um coco Gram-positivo, β -hemolítico e pertencente ao grupo A pela classificação de Lancefield. É um importante patógeno causador de doenças supurativas e complicações não supurativas. Entre as bactérias, o *S. pyogenes*, é a causa mais comum de faringite. Estes microrganismos se tornaram alvo importante de estudos nos dias atuais em virtude de sua capacidade de produzir doenças graves e potencialmente fatais quando não identificados e tratados rapidamente. Por sua transmissão ser através de aerossóis, locais com aglomerações aumenta a oportunidade de disseminação desse microrganismo. Acomete principalmente crianças entre 5 e 15 anos, mas lactentes e adultos são também suscetíveis. A detecção do *S. pyogenes* pode ser através de técnicas bioquímicas, microbiológicas e imunológicas. O presente trabalho teve como objetivo a produção de soro hiperimune antiestreptolisina "O" (ASLO) para o diagnóstico de infecção recente causada por *S. pyogenes*. Para a produção do antissoro, foram imunizados por injeções subcutâneas 2 coelhos machos da raça New Zealand. Por meio de técnicas de turbidimetria e imunodifusão dupla, foram analisadas a especificidade e a concentração de anticorpo, onde foi possível concluir que os animais tiveram uma resposta imunológica com um título de 14,4UI/mL (cobaia 01) e 19,1UI/ml (cobaia 02).

Palavras-chave: *Streptococcus pyogenes*. Antiestreptolisina "O". Imunodiagnóstico. Sorologia.

ABSTRACT

Streptococcus pyogenes is a coccus Gram-positive, β -hemolytic and it belongs to the group A for the classification of Lancefield. It is an important pathogen causing diseases suppuratives and complications not suppuratives. Among the bacterias, the *S. pyogenes*, is without a doubt the cause more common of pharyngitis. These microorganisms became object important of studies nowadays in virtue of it's capacity to produce diseases serious and fatal potentially when not identified and treated quickly. For it's transmission to be through aerosols, local with gatherings they increase the opportunity of dissemination of these microorganism. It attacks mainly among children between 5 and 15 years, but infants and adults are also susceptible. The detection of the *S. pyogenes* can be through biochemical techniques, microbiological and immunological. The present work had as objective the production of serum hyper immune antistreptolysin "O" for the diagnosis of recent infection caused by *S. pyogenes*. For the production of the anti serum, they were immunized by injections subcutaneous two male rabbits of the race New Zealand. By means of turbidimetria techniques and double immune diffusion, were analyzed the specificity and the antibody concentration, where it was possible to conclude that the animals had a answer immunological satisfactory with a title of 14,4UI/mL (guinea 01) and 19,1UI/ml (guinea 02).

Key-words: *Streptococcus pyogenes*. Antistreptolysin "O". Immunodiagnosis. Serology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Tipos de hemólise.....	12
Figura 02 – Aglutinação.....	29
Figura 03 – Imunodifusão dupla.....	35
Figura 04 – Placa de imunodifusão.....	37
Figura 05 – Turbidimetria.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SBHGA – Estreptococo beta hemolítico do grupo A.....	12
GAS – Grupo A estreptococci.....	12
FR – Febre reumática.....	12
GN – Glomerulonefrite	12
FN – Fascite necrotizante.....	13
SSCT – Síndrome semelhante ao choque tóxico.....	13
SLS – Estreptolisina “S”.....	15
SLO – Estreptolisina “O”.....	15
PMN – Polimorfonucleares.....	15
ASLO – Antiestreptolisina “O”.....	16
SPE – Exotoxina estreptocócica pirogênica.....	16
DNase – Desoxirribonuclease.....	17
DPNase – Disfosfopiridina-nucleotidase.....	17
ASK – Antiestreptoquinase.....	17
AHAD – Antihialuronidase.....	17
ADNase – Antidesoxirribonuclease-B.....	17
ANADase – Antinicotinamida adenina dinucleotidase.....	17
ASE – Antiesterase.....	17
LAP – Leucina aminopeptidase.....	19
PYR – L-pirrolidonil- β - naftilamida.....	19
VHS – Velocidade de hemossedimentação.....	24
PCR – Proteína C-reativa.....	24
CFA – Adjuvante completo de Freund.....	31
LC – Laboratório clínico.....	31
Ag-Ac – Antígeno-anticorpo.....	35
ID – Imunodifusão dupla.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 <i>STREPTOCOCCUS PYOGENES</i>	12
2.1 Fatores de virulência	15
2.2 Aspectos imunológicos	17
2.3 Diagnóstico	18
2.3.1 Testes laboratoriais rápidos	19
3 PRINCIPAIS DOENÇAS PÓS INFECÇÕES ESTREPTOCÓCICAS	21
3.1 Doenças estreptocócicas supurativas	21
3.1.1 Importância clínica	21
3.2 Complicações estreptocócicas não supurativas	22
3.2.1 Febre reumática	22
3.2.2 Glomerulonefrite	25
4 ANTIESTREPTOLISINA “O” (ASLO)	27
4.1 Reação do látex	28
5 PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE	30
5.1 O uso de controles no laboratório de análises clínicas	31
6 MATERIAIS E MÉTODOS	33
6.1 Aclimação dos animais	33
6.2 Sequência das imunizações	33
6.3 Purificação do antissoro	34
6.4 Testes de qualidade do antissoro	34
6.4.1 Avaliação da especificidade do antissoro.....	34
6.4.2 Avaliação da concentração do antissoro.....	35
7 RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
7.1 Controle negativo	37
7.2 Imunodifusão dupla (ID)	37
7.3 Turbidimetria	38
CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO A – VOLUMES ADOTADOS NA IMUNIZAÇÃO	44
ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA	45

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus pyogenes é uma importante bactéria patogênica Gram-positiva, que coloniza principalmente a orofaringe e a pele, sendo responsável por processos infecciosos supurativos e não supurativos. Este patógeno está relacionado à formação de autoanticorpos contra estruturas do nosso organismo, por exemplo, coração, tecido sinovial, sistema nervoso central e outros.

Nos dias atuais, há uma preocupação grande entre os profissionais da área de saúde, principalmente infantil, pois é onde se encontram os principais afetados pelo crescente e contínuo aumento dos casos de doenças causadas pelo *S. pyogenes*. Dessa forma, Benthien (2002) acredita que com medidas de higiene pessoal e ambiental, a detecção de “portadores saudáveis” e o controle, em fase inicial, dos surtos epidêmicos, podem e devem beneficiar indivíduos com passado reumático e uma população desconhecida e latente de candidatos ao primeiro surto das enfermidades.

A febre reumática é uma seqüela de infecção orofaríngea estreptocócica que não foi devidamente tratada. A presença de *S. pyogenes* pode ser detectada através da antiestreptolisina “O”, devido às alterações detectáveis nos exames, como o aumento significativo de anticorpos. Desta maneira, possibilita diagnósticos precoces, contribuindo para futuras intervenções profiláticas ou terapêuticas nos pacientes com doenças reumáticas e naqueles com risco elevado de desenvolvê-las.

As técnicas imunológicas são cada vez mais utilizadas pelos laboratórios de análises clínicas para a análise *in vitro* de uma variedade de analitos, dentro delas destaca-se as técnicas de turbidimetria e de aglutinação. Estas técnicas são aplicadas para a detecção das mais diferentes afecções que acometem o ser humano.

Nas últimas décadas houve um grande desenvolvimento na automação dos processos do laboratório clínico, principalmente nas áreas de bioquímica clínica e hematologia, todavia na de imunologia clínica o processo só ocorreu mais recentemente, constituindo uma das últimas áreas a ser automatizada. A imunoturbidimetria é uma técnica de automação relevante, pois os resultados são altamente específicos, fornecidos com rapidez e precisão, minimizando as variações inerentes aos processos manuais, reduzindo os riscos de erros técnicos humanos e custos. A técnica imunoturbidimétrica é quantitativa, podendo ser empregada tanto em sistema semi-automatizado ou automatizado e por isso necessita de

controles e calibradores, assim como na técnica de aglutinação que apesar de ser semi-quantitativa há necessidade de controle positivo e negativo.

Espera-se com este trabalho produzir soro hiperimmune antiestreptolisina "O" que poderá ser usado na fabricação de controles e calibradores que são componentes de *Kits* imunológicos e auxiliar no diagnóstico de infecção por *S. pyogenes*, uma vez que a febre reumática (não supurativa) implica grandes gastos com a saúde por se tratar de doença crônica que necessita de acompanhamento clínico.

Os objetivos deste trabalho são baseados na produção de soro hiperimmune antiestreptolisina "O" e a aplicação deste antissoro no diagnóstico *in vitro* de uma infecção recente por *S. pyogenes*.

As questões que nortearam a investigação realizada nesta monografia foram: os títulos de anticorpos produzidos pelos coelhos serão obtidos em concentrações significativas? Os anticorpos produzidos possuem especificidade e sensibilidade contra a estreptolisina "O"? A produção do soro hiperimmune poderá ser utilizada como insumo na confecção de controles e calibradores que compõe um *kit*?

No segundo capítulo serão abordadas as três maneiras ainda utilizadas para classificação dos estreptococos, as principais características do *S. pyogenes*, assim como seus aspectos estruturais, fisiológicos, patogênicos, imunológicos, epidemiológicos, seus fatores de virulência e os principais métodos de diagnosticá-los.

Já no terceiro capítulo serão retratadas as consequências pós infecções estreptocócicas, havendo um esclarecimento sobre as doenças supurativas e complicações não supurativas, além de serem apresentadas as principais características das doenças e como se manifestam.

O quarto capítulo tem como foco principal abordar como diagnosticar uma infecção recente por *S. pyogenes*, através da ASLO, uma vez que atualmente este é o teste de maior aplicabilidade e utilizado como rotina nos laboratórios, devido sua capacidade de detectar o aumento dos anticorpos antiestreptolisina "O".

O quinto capítulo versa o método utilizado nessa pesquisa para produção de soro hiperimmune, explica-se qual a finalidade de se utilizar o adjuvante de Freund e o porquê de ser recomendada a utilização de duas cobaias quando se trata de pesquisa em animais.

No sexto capítulo deseja-se demonstrar quais técnicas foram aplicadas e como estas foram realizadas. Dessa mesma forma, pretende-se no sétimo capítulo apresentar os resultados obtidos durante a pesquisa.



2 *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Podem ser também denominados como estreptococo beta hemolítico do grupo A (SBHGA) ou como GAS (grupo A estreptococci) (MURRAY et al, 2000). A espécie *S. pyogenes* tem mostrado alto poder de adaptação ao hospedeiro humano, atuando como importante agente etiológico de uma série de manifestações clínicas, entre as quais predomina a orofaringite bacteriana, assim como sequelas não supurativas, representadas pela febre reumática (FR) e a glomerulonefrite (GN) e as doenças supurativas (STREPTOCOCCUS..., [2000?]).

Os estreptococos patogênicos possuem diversas características que contribuem para sua virulência. Os mecanismos de virulência do *S. pyogenes*, em particular foram mais extensamente estudados, pois este continua sendo um patógeno de extrema importância, onde a pele e mucosas dos seres humanos constituem os únicos reservatórios conhecidos deste microrganismo (KONEMAN et al, 2008).

Segundo Murray et al (2000), o papel dos estreptococos na doença humana é conhecido há muito tempo, entretanto, a diferenciação das espécies dentro do gênero *Streptococcus* é muito complexa, visto que pelo menos três esquemas diferentes são ainda utilizados para a classificação destes microrganismos:

- **Propriedades sorológicas:** grupos A a H de Lancefield, K a V.
- **Propriedades bioquímicas:** fisiológicas.
- **Padrões hemolíticos:** hemólise [β] completa, hemólise [α] incompleta e ausência de hemólise [γ] (figura 01).

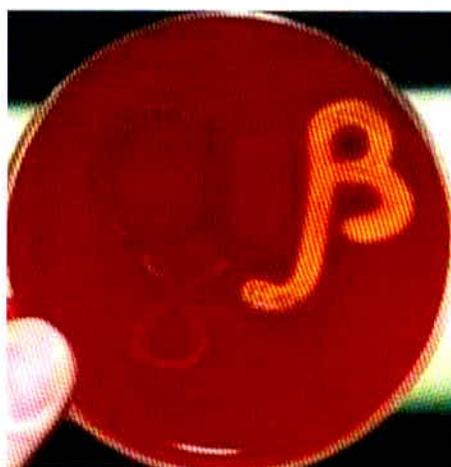


Figura 01 – Tipos de hemólise. Os caracteres (β, α, γ) são representativos de hemólise em ágar sangue causada pelos *Streptococcus*.

Rebecca Lancefield contribuiu grandemente para o conhecimento dos estreptococos, com a descoberta do polissacarídeo de grupo e da proteína M da parede celular, sendo estas moléculas antigênicas a base para a tipagem destes microrganismos (EFSTRATIOU, 2000 apud NOSCHANG, 2006).

O esquema de classificação sorológico foi desenvolvido por Lancefield em 1933 e aplicada inicialmente para diferenciar as cepas β -hemolíticas. Os antígenos detectados no sistema de grupamento de Lancefield consistem na presença de polissacarídeos da parede celular (como nos estreptococos do grupo A, B, C, F e G de seres humanos) ou na presença de ácidos lipoteicóicos da parede celular (estreptococos do grupo D e espécies de *Enterococcus*) (KONEMAN et al, 2008). A maioria das cepas β -hemolíticas, algumas cepas α -hemolíticas e não hemolíticas, possuem antígenos grupo específico, sendo a maior parte constituída por carboidratos na parede celular (MURRAY et al, 2000). Alguns estreptococos não possuem estes antígenos de parede celular grupo específico, assim, por exemplo, os microrganismos como *S. pneumoniae* e as numerosas espécies de estreptococos α e γ -hemolíticos são coletivamente denominados *Streptococcus* do grupo *viridans* (incluindo *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *S. anginosus*) e devem ser identificados por meio de suas propriedades fisiológicas (MURRAY et al, 2000; REISNER; WOODS, 2008).

Nos anos 70, pensou-se que as sérias infecções por *S. pyogenes* haviam sido totalmente erradicadas nos países desenvolvidos. Entretanto, no fim da década dos anos 80 reapareceu a preocupação com doenças causadas por este patógeno, passando a serem observadas com frequência crescente em muitos países, devido a surtos de FR ocorridos em diferentes áreas, além de casos de doenças sistêmicas com severas complicações como, por exemplo, fascite necrotizante (FN), miosite, bacteremia, escarlatina maligna e a síndrome semelhante ao choque tóxico (SSCT) (LAU et al, 2003 apud NOSCHANG, 2006; REISNER; WOODS, 2008).

O reaparecimento destas infecções e suas sequelas não estão totalmente compreendidos, mas podem ser atribuídas a mudanças na epidemiologia de infecções precedentes por estreptococos, mudanças na suscetibilidade da bactéria a antibióticos comumente usados, e as mudanças na prevalência de sorotipos de maior virulência (MELO et al, 2003 apud NOSCHANG, 2006; REISNER; WOODS, 2008).

A maioria das infecções causadas por *S. pyogenes* se iniciam nas vias aéreas superiores (faringe) ou na pele. Nas infecções da faringe, os estreptococos são, de modo geral,

transmitidos por meio de aerossóis, e a primeira etapa dessa infecção consiste na sua adesão ao epitélio da mucosa (STREPTOCOCCUS..., [2000?]).

As infecções cutâneas são geralmente adquiridas por contato com pacientes portadores de piodermites, assim instalam-se quando a pele apresenta lesões provocadas por traumas, picadas de inseto, cirurgias e por outros meios nem sempre evidentes. As infecções podem ser superficiais ou profundas, estas últimas podendo ser fatais (STREPTOCOCCUS..., [2000?]).

S. pyogenes podem colonizar quase todos os tecidos do organismo, mas o trato respiratório superior e lesões de pele servem como foco primário da infecção e reservatórios principais de transmissão (KAO et al, 2005 apud NOSCHANG, 2006). Comumente essas bactérias colonizam a orofaringe de crianças saudáveis (15 a 30%) e adultos jovens (5 a 10%, embora lactentes também sejam suscetíveis), sendo esta colonização transitória e regulada pela capacidade do indivíduo de desenvolver uma imunidade específica contra proteína M da cepa colonizadora e pela presença de microrganismos competitivos na orofaringe. Portanto, no geral, a doença por *S. pyogenes* é causada por cepas recentemente adquiridas, capazes de estabelecer uma infecção da faringe ou da pele, antes da produção de anticorpos específicos, ou antes, da capacidade proliferativa de microrganismos competitivos (MURRAY et al, 2000).

A maioria das faringites é de etiologia viral, mas, somente para as faringites estreptocócicas (cerca de 30 a 40%) (MENON et al, 2004 apud NOSCHANG, 2006; ENDO; CARVALHO; SAKANO, 1998; SANTOS; WECKX; PIGNATARI, 2003 apud VIEIRA et al, 2006) é indicado tratamento com antibiótico, por causa da possibilidade de ocorrer complicações, como a GN e a FR (representam 90% das indicações de cirurgia para troca de valvas cardíacas em crianças no Brasil) (MENON et al, 2004 apud NOSCHANG, 2006; ATIK, 1999 apud VIEIRA et al, 2006) e entre as bactérias, o *S. pyogenes*, é sem dúvida a causa mais comum de faringite, acrescenta Scalabrin (2003).

A faringite estreptocócica apresenta diferentes sinais e sintomas, entretanto, nenhum dos parâmetros é específico e pode ocorrer em faringites causadas por outros agentes infecciosos do trato respiratório superior. Desta forma, o diagnóstico definitivo da faringite estreptocócica aguda em crianças e adolescentes deve ser evidenciado através dos aspectos clínicos e epidemiológicos e amparados pelos resultados dos testes laboratoriais (BISNO et al, 2001 apud SCALABRIN, 2003, p. 816).

2.1 Fatores de virulência

A virulência dos *S. pyogenes* é determinada por uma variedade de moléculas estruturais, toxinas e enzimas. As manifestações clínicas observadas podem ser diretamente relacionadas aos efeitos de substâncias, como as exotoxinas pirogênicas e estreptolisinas (MURRAY et al, 2000).

A cápsula é a camada mais externa da célula, constituída de ácido hialurônico. Quimicamente esse material capsular é idêntico à substância fundamental ao tecido conjuntivo, por esta razão, atribui-se a este fato a não imunogenicidade dessa substância no hospedeiro infectado. Também protege as bactérias contra a fagocitose e assim como a proteína M, está envolvida na necrose de tecidos, invasão e doença sistêmica causadas por *S. pyogenes* (KONEMAN et al, 2008; MURRAY et al, 2000).

A capacidade do *S. pyogenes* invadir tecidos é atribuída a vários fatores de virulência, entre eles, a proteína M da parede celular (LAU et al, 2003 apud NOSCHANG, 2006). Além do seu papel como fator de virulência, a proteína M também desfruta de grande importância prática, pois devido à sua variabilidade antigênica é permitido classificar essa bactéria em sorotipos, sendo muito útil para o entendimento epidemiológico e patogênico das infecções estreptocócicas (NOSCHANG, 2006).

S. pyogenes produzem duas hemolisinas O e S. A estreptolisina “S” (SLS) é uma hemolisina estável na presença de oxigênio, não imunogênica e tóxica para uma variedade de tipos celulares (acredita-se que a SLS interage com fosfolipídeos de membrana para exercer seus efeitos tóxicos). A SLS existe nas formas intracelular, ligada à superfície celular e intracelular. Quando (SLS) ligada à célula, a exemplo da estreptolisina “O” (SLO), é capaz de danificar as membranas de células polimorfonucleares (PMN) e plaquetas. Já os eritrócitos quando expostos a SLS sofrem intumescimento, seguido de lise devido à ruptura da barreira osmótica e ao extravasamento de íons da célula (ALOUF; LORIDAN, 1988 apud KONEMAN et al, 2008), mas ao contrário da SLO e dos outros tipos celulares citados não são observados à microscopia eletrônica poros nem fendas nas membranas dos eritrócitos afetados. A SLS também estimula a liberação do conteúdo lisossômico após fagocitose, com morte subsequente da célula fagocitária. A SLS é ativa na hemólise de superfície e abaixo de superfície quando os microrganismos crescem em ágar sangue de carneiro (KONEMAN et al, 2008; MURRAY et al, 2000).

A SLO é inativada de maneira reversível pelo oxigênio e irreversível pelo colesterol. Devido sua labilidade ao oxigênio, a SLO é responsável inicialmente pela β -hemólise observada ao redor das colônias de *S. pyogenes* localizadas abaixo da superfície em placas com semeadura em profundidade ou nas regiões perfuradas de placas de ágar sangue de carneiro semeadas na superfície. É uma enzima antigênica, e ao contrário da SLS, verifica-se a formação imediata de anticorpos contra a estreptolisina “O” (antiestreptolisina “O”) que são úteis para detectar uma infecção orofaríngea recente por *S. pyogenes* através do teste ASLO (detecta títulos elevados desses anticorpos no soro). A resposta da ASLO após infecções cutâneas é precária, isto pode ser devido à inativação do antígeno pelo colesterol presente na pele. Tóxica para uma variedade de tipos celulares, incluindo células de cultura, monócitos e leucócitos. A ASLO induz a formação de poros na membrana de células suscetíveis com subsequente lise osmótica da célula afetada, também inibe a fagocitose pelos macrófagos, provoca degranulação e lise dos PMN com liberação de enzimas hidrolíticas (KONEMAN et al, 2008; MURRAY et al, 2000), promovendo as reações inflamatórias e citotóxicas. Atualmente há estudos mostrando que a estreptolisina “O” seria um mediador não antigênico das reações de reatividade cruzada entre estruturas da bactéria e estruturas do organismo humano (DAJANI et al, 1992; BREESE; HALL, 1980; KRAUSE, 1988 apud OLIVEIRA; SILVA; VIJLE, 1997). Mas ainda se desconhece uma comprovação do papel das estreptolisinas na patogênese da doença humana, observa Reisner e Woods (2008).

As exotoxinas estreptocócicas pirogênicas (SPE), inicialmente denominadas toxinas eritrogênicas, são produzidas por cepas lisogênicas de estreptococos e assemelham-se à toxina produzida por *Corynebacterium diphtheriae*. Foram descritas três toxinas termolábeis (SPE A, SPE B e SPE C) e imunologicamente distintas, em *S. pyogenes* (MURRAY et al, 2000). Estas toxinas atuam como superantígenos e interagem com células de defesa, havendo liberação de algumas citocinas. Estas citocinas medeiam uma variedade de efeitos importantes, pois constituem os principais determinantes da virulência na patogenia da síndrome estreptocócica semelhante ao choque tóxico e a falência orgânica, onde normalmente podem ser observados em pacientes com doença estreptocócica grave. As toxinas (particularmente a SPE A e SPE B) são responsáveis pelo aparecimento do exantema observado em pacientes com escarlatina. Foi detectada a presença da exotoxina A em mais da metade das cepas de *S. pyogenes* responsáveis pela doença do choque tóxico estreptocócico grave, embora esta toxina seja essencial na patogenia da doença, outros fatores também são importantes (KONEMAN et al, 2008; MURRAY et al, 2000).

Foram descritas outras enzimas que também desempenham um papel importante como fatores de virulência, incluindo hialuronidase, desoxirribonuclease (DNase A, B, C, D), estreptoquinases (A e B), α -lipoproteinase, C5a peptidase, disfosfopiridina-nucleotidase (DPNase) (MURRAY et al, 2000).

2.2 Aspectos imunológicos

Uma faringite estreptocócica, na maioria dos pacientes, leva a uma resposta de anticorpos aos produtos extracelulares de *S. pyogenes* como, por exemplo, Anti-SLO (ASLO), antiestreptoquinase (ASK), antihialuronidase (AHAD), antidesoxirribonuclease-B (ADNase), antinicotinamida adenina dinucleotidase (ANADase) e antiesterase (ASE). A resposta de anticorpos a qualquer estreptococo varia entre indivíduos e depende do sítio de infecção (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

A infecção estreptocócica das vias aéreas superiores estimula a produção de vários anticorpos (autoanticorpos) que interagem com o tecido conectivo humano e inicia uma resposta inflamatória sistêmica (LEIRISALO, 1997; AYOUB, 1986 apud OLIVEIRA; SILVA; VIJLE, 1997). Uma possível explicação é a existência de semelhanças antigênicas entre os componentes do *Streptococcus* e os tecidos humanos (BESSEN; JONES; FISCHETTI, 1989; AYOUB, 1986 apud OLIVEIRA; SILVA; VIJLE, 1997). *S. pyogenes* contém antígenos que são imunologicamente transreativos com o tecido cardíaco humano (trompomiosina) (BESSEN; JONES; FISCHETTI, 1989; LEIRISALO, 1997 apud OLIVEIRA; SILVA; VIJLE, 1997).

Pesquisadores constataram a ocorrência de reações imunológicas cruzadas semelhantes entre o antígeno polissacarídico de *S. pyogenes* e certas glicoproteínas das valvas cardíacas, entre o ácido hialurônico estreptocócico (material capsular) e o ácido hialurônico humano, entre as membranas celulares dos estreptococos e os núcleos neuronais caudado e subtalâmico do sistema nervoso central humano (FILLIT; McCARTY; BLAKE, 1986; GOLDSTEIN et al, 1968; HUSBY et al, 1976; SCHWAB; CROMARTIE, 1960 apud KONEMAN et al, 2008). Estas últimas podem explicar o papel da infecção estreptocócica antecedente nos componentes neurológicos da FR. De forma semelhante, foram também

**SISTEMA DE BIBLIOTECAS
FEPESMIG**

BIBLIOTECA MONSENHOR DOMINGOS PRADO FONSECA

identificadas cepas nefritogênicas de *S. pyogenes* pertencentes a certos tipos M (KONEMAN et al, 2008) ¹.

2.3 Diagnóstico

A necessidade do diagnóstico bacteriológico de faringite estreptocócica baseia-se no fato de que esta infecção deve ser tratada com agentes antimicrobianos. Muitas vezes não é possível diferenciar clinicamente uma faringoamigdalite causada por *S. pyogenes* de uma infecção provocada por outros agentes infecciosos, como os vírus, pois existem poucos sinais clínicos específicos e estes frequentemente falham (BISNO et al, 1997 apud SCALABRIN, 2003).

Muitos dos testes rápidos apresentam especificidade excelente ($\geq 95\%$) quando comparados com culturas em ágar sangue, desta forma a terapia antimicrobiana pode ser iniciada com base em resultados positivos de testes rápidos de boa qualidade (HEITER; BOURBEAU, 1995; NEEDHAM; McPHERSON; WEBB, 1998 apud SCALABRIN, 2003). Entretanto, a sensibilidade da maioria dos testes rápidos é inferior à da cultura (80 a 90%), por este motivo os testes rápidos negativos de crianças e adolescentes devem ser confirmados com a cultura da orofaringe (BISNO, 2001 apud SCALABRIN, 2003).

Devido à baixa incidência de faringite e risco mínimo de desenvolvimento da FR em indivíduos com idade acima de 20 anos, sugere-se que o diagnóstico em adultos normais seja realizado apenas através de testes rápidos de alta sensibilidade em associação com o diagnóstico clínico ou o uso dos critérios clínicos apenas (COOPER, 2001 apud SCALABRIN, 2003).

As recomendações internacionais sugerem para a maioria dos casos de faringite estreptocócica, acompanhamento clínico e o uso de testes laboratoriais para confirmar a presença da bactéria na orofaringe (BISNO et al, 1997; BISNO, 2001 apud SCALABRIN, 2003).

Nos países desenvolvidos a cultura e os testes rápidos de detecção de antígeno estreptocócico em material colhido da orofaringe são preconizados de rotina, o que não acontece em nosso país, onde a maioria dos casos de faringoamigdalite fica sem o acompanhamento laboratorial. Geralmente, são verificados apenas os sinais e os sintomas clínicos do paciente que, muitas vezes, levam à prescrição desnecessária de agentes antimicrobianos (SCALABRIN, 2003, p. 815).

¹ Os aspectos genéticos não foram aprofundados na presente pesquisa.

Os estreptococos isolados de amostras clínicas humanas são identificados através de suas propriedades hemolíticas, testes sorológicos para detecção de antígenos capsulares ou de parede celular, testes fisiológicos e bioquímicos. Alguns desses testes realizados no laboratório fornecem resultados presuntivos, enquanto outros proporcionam resultados definitivos. Portanto, antes de efetuar testes para identificação, é preciso certificar-se de que os cocos Gram positivos em estudo sejam catalase negativo, classificando-os nos grupos de *Streptococcus* (KONEMAN et al, 2008).

Antigamente, as únicas exigências para a caracterização preliminar dos *S. pyogenes* eram a determinação da ocorrência de hemólise e o resultado do teste de catalase. Entretanto, com o reconhecimento de vários outros grupos de bactérias semelhantes à *Streptococcus* em infecções humanas, designou-se a necessidade de efetuar testes adicionais. Esses e outros microrganismos “de aspecto semelhante” podem ser preliminarmente diferenciados entre si e das espécies de *Streptococcus* e *Enterococcus* através de determinados testes como, por exemplo, morfologia na coloração pelo Gram, hemólise em ágar sangue de carneiro, teste de catalase, teste de leucina aminopeptidase (LAP), teste de pirrolidônil arilamidase (PYR), motilidade, sensibilidade à vancomicina entre outros (KONEMAN et al, 2008).

A cultura tradicional de estreptococos em ágar sangue, incluindo a identificação definitiva de *S. pyogenes*, pode levar 24 a 48 horas (DAJANI, 1995 apud SCALABRIN, 2003), por esta razão, tem sido cada vez mais comum o uso de testes rápidos, como por exemplo, os imunológicos para pesquisa de antígenos estreptocócicos (CUNNINGHAM, 2000 apud SCALABRIN, 2003).

2.3.1 Testes laboratoriais rápidos

Detecção antigênica: As técnicas para detecção direta do *S. pyogenes* em amostras de *swab* de garganta sem o uso de culturas vêm sendo amplamente empregadas em laboratórios clínicos desde o início da década de 1980. Nos *Kits* comercializados, são utilizados métodos de aglutinação em látex ou imunoensaio para a detecção dos antígenos (KONEMAN et al, 2008; MURRAY et al, 2000; TRABULSI et al, 2002). Embora estes ensaios sejam muito específicos, a sensibilidade dos testes é baixa (provavelmente inferior a 75 a 80%), assim todos os resultados negativos devem ser confirmados através de culturas (CUNNINGHAM, 2000 apud SCALABRIN, 2003).

Detecção de anticorpos: Os exames sorológicos para detectar os anticorpos em amostras de soro agudo ou convalescente para estreptolisina “O” e DNase B são utilizados primariamente para diagnosticar a FR e a GN após infecção com *S. pyogenes* (REISNER; WOODS, 2008), sendo a antiestreptolisina “O” (ASLO) o teste laboratorial mais comumente utilizado para determinar uma infecção anterior por *S. pyogenes* e seu estado evolutivo (PRESTES-CARNEIRO; ACÊNCIO; POMPEI, 2005).

Os pacientes com doença causada por este microrganismo produzem anticorpos contra muitas enzimas específicas. Embora haja produção de anticorpos contra proteína M, que são importantes para manter a imunidade, estes anticorpos aparecem tardiamente na evolução clínica da doença e são tipo-específicos. Ao contrário, a determinação dos anticorpos contra a estreptolisina “O” é útil para confirmar a presença de FR e GN em decorrência de infecção estreptocócica recente, além de estes anticorpos aparecerem 3 a 4 semanas após a exposição inicial ao microrganismo e persistirem (MURRAY et al, 2000).

A produção de outros anticorpos contra enzimas estreptocócicas, em particular a DNase B, pode ser detectada em pacientes com piodermite e faringite estreptocócicas, devendo-se realizar o teste anti-DNase B se houver suspeita de GN estreptocócica (MURRAY et al, 2000). Fato importante que, após piodermites, os níveis de ASLO são geralmente baixos, pois esta hemolisina é provavelmente inativada pelos lipídeos cutâneos, acrescenta Trabulsi et al (2002).

A responsabilidade deste patógeno pelo processo infeccioso terá que ser determinada juntamente com as manifestações clínicas do paciente e pela pesquisa de anticorpos séricos duas a três semanas após o início da doença. Os três exames mais utilizados para o diagnóstico sorológico das infecções pelo *S. pyogenes* são os que detectam anticorpos contra estreptolisina “O” (evidencia anticorpos em 85% dos pacientes), hialuronidase (evidencia anticorpos em 95% dos pacientes) e desoxirribonuclease (evidencia anticorpos em 95% dos pacientes), quando são realizados todos juntos, o exame evidencia anticorpos em praticamente 100% dos pacientes. Importante lembrar que a ausência de resposta sorológica potente, geralmente indica que as manifestações reumatológicas e renais não estão relacionadas a uma infecção pelo *S. pyogenes* (TRABULSI et al, 2002).

3 PRINCIPAIS DOENÇAS PÓS INFECÇÕES ESTREPTOCÓCICAS

3.1 Doenças estreptocócicas supurativas

3.1.1 Importância clínica

As infecções mais frequentes causadas pelo *S. pyogenes* localizam-se na faringe (faringite) e amígdalas (faringoamigdalites), e na pele (piodermites e erisipela). Disseminando-se a partir destes focos primários, particularmente das faringoamigdalites, a bactéria pode determinar bacteremia e infectar diferentes órgãos e tecidos do organismo, podendo dar origem as sequelas não supurativas (TRABULSI et al, 2002).

A faringite estreptocócica é a infecção mais comum causada pelo *S. pyogenes*, onde a maioria dos casos pode ser observada em crianças de idade escolar (5 a 15 anos), principalmente durante o inverno ou a primavera. Depois de um período de incubação a parte posterior da faringe pode encontrar-se inflamada e edemaciada, podendo haver um exsudato branco-acizentado sobre as amígdalas e apresentar febre. As complicações da faringite estreptocócica podem ser supurativas (abscesso peritonsilar, abscesso retrofaringeo, adenite cervical supurativa, otite média, sinusite, mastoidite, bacteremia), não supurativas (febre reumática aguda e crônica, glomerulonefrite) ou mediadas por toxinas (síndrome semelhante ao choque tóxico) (SHULMAN, 1994; SHULMAN, 2003 apud KONEMAN et al, 2008). Em casos de ausência de complicações, a faringite estreptocócica é autolimitada. Além da faringite, esse microrganismo pode causar uma variedade de infecções cutâneas superficiais, incluindo impetigo (piodermite), erisipela, celulite, sepse puerperal e infecções pós-parto (KONEMAN et al, 2008). Mas existem outras doenças que ocorrem devido a complicações de uma faringite estreptocócica como, por exemplo, a escarlatina que ocorre quando estimula a produção de uma exotoxina pirogênica. A princípio, a língua é recoberta por um revestimento branco-amarelado que posteriormente é retirado, mostrando uma superfície vermelha e inflamada (“língua de morango”). O exantema desaparece em 5 a 7 dias, sendo acompanhado de descamação (MURRAY et al, 2000).

A fascite necrotizante (FN) é uma infecção que ocorre profundamente no tecido subcutâneo e caracteriza-se por extensa destruição do músculo e da gordura, disseminando-se ao longo dos planos fasciais. Inicialmente, há evidências de celulite, e, em seguida, formam-se bolhas, ocorre gangrena e sintomas sistêmicos. Esta doença caracteriza-se por toxicidade sistêmica, falência de múltiplos órgãos e morte (taxa de mortalidade superior a 50%). Consequentemente é necessário um tratamento imediato para a sua prevenção e a fascite deve ser tratada agressivamente com desbridamento cirúrgico do tecido não viável (MURRAY et al, 2000).

3.2 Complicações estreptocócicas não supurativas

No manejo da faringite, existe muita preocupação quanto às complicações não supurativas (complicações de natureza não infecciosa) bem conhecidas das infecções por *Streptococcus pyogenes*: a febre reumática e a glomerulonefrite (BISNO, 2000; MARKOWITZ; KAPLAN, 2000; STOLLERMAN, 2001 apud KONEMAN et al, 2008). Os *S. pyogenes* variam na sua capacidade de provocar FR ou GN, e, atualmente, foram identificados determinados tipos M de estreptococos como reumatogênicos ou nefritogênicos (KONEMAN et al, 2008).

3.2.1 Febre reumática

A febre reumática (FR - *rheumatic fever*) é uma complicação não supurativa, inflamatória, sistêmica e autoimune da infecção recente por *S. pyogenes* (estreptococo β-hemolítico do grupo A, de cepa reumatogênica) e ocorre de 2 a 5 semanas após uma faringite por esta bactéria (BISNO, 2000 apud KONEMAN et al, 2008). Pode ocorrer em qualquer idade, mas acomete preferencialmente, indivíduos com 5 a 15 anos de idade (KONEMAN et al, 2008), sendo responsável por frequentes episódios de faringite ou faringoamidalite estreptocócica (TRABULSI et al, 2002). A profilaxia do primeiro surto de FR depende do diagnóstico preciso de faringoamidalite estreptocócica e da indicação precoce de tratamento específico adequado (KONEMAN et al, 2008).

A infecção na garganta é transmitida de pessoa para pessoa e, portanto, quanto maior o número de pessoas aglomeradas, maior o risco de contrair a doença. Desta forma, torna-se fácil a disseminação e aumentam as chances de propagação da infecção em locais que reúnem muitas pessoas (informações mencionadas e esclarecidas no capítulo 2). Esse é o motivo pelo qual a FR incide com maior frequência nos países em desenvolvimento (desinformação, ajuntamento em moradias pequenas) (SILVA, [20-]).

Para apresentar a FR, é preciso ter predisposição genética e, por isso, apenas 3% daqueles que tem infecção na garganta pelo *S. pyogenes* apresentam a doença (SILVA, [20-]). Sendo um exemplo muito comum, as crianças, onde inúmeras dessas apresentam frequentes infecções de garganta, especialmente nos primeiros anos de vida. Porém, isto não é suficiente para predispô-las a apresentar FR. Em um terço dos casos, a estreptococcia é inaparente e menos de 10% dos adultos e 15 a 20% das crianças normais são portadoras assintomáticas de *S. pyogenes* em orofaringe ou nasofaringe (BENTHIEN, 2002). Os indivíduos que sofrem um episódio de FR são particularmente predispostos a outros episódios, em consequência de infecções estreptocócicas, subseqüentes, das vias aéreas superiores (TRABULSI et al, 2002).

Uma das consequências da FR são as sequelas cardíacas (cardítes) que sucedem às crises agudas, que de acordo com a Sociedade Brasileira de Reumatologia – SBR (2005) são caracterizadas por inflamação nas três camadas (na membrana que o reveste, no músculo e no tecido que recobre as válvulas). Suas complicações correspondem principalmente às lesões das válvulas mitral e aórtica. Essas lesões valvulares reumáticas são as mais frequentes lesões cardíacas nos jovens, e uma das principais causas que levam à cirurgia cardíaca (SILVA, [20-]). A cardite é a manifestação clínica mais típica e significativa da FR, podendo causar danos irreversíveis no coração ou até mesmo a morte do paciente, pois sistema de defesa da pessoa, em resposta à infecção pelo *S. pyogenes*, ataca os tecidos do coração, com mais frequência os tecidos das válvulas. Normalmente se encontra de forma assintomática, dificultando o seu diagnóstico, mas quando se apresenta associada a outros sinais, conduz ao diagnóstico de forma direta (SILVA, [20-]). Além da válvula mitral, a patologia cardíaca afeta frequentemente o endocárdio, o miocárdio e o pericárdio (KONEMAN et al, 2008).

A artrite é a manifestação mais frequente (80%) e os sinais clínicos correspondem a dor, inchaço, calor, rubor nas articulações e limitação dos movimentos. A dor geralmente é intensa, de curta duração e regride de forma espontânea. Atinge com maior frequência múltiplas articulações (joelhos, tornozelos, cotovelos, punhos e ombros) e, com menor frequência os sintomas surgem na coluna e nas pequenas articulações de mãos e pés (SILVA,

[20-]). Quando simultaneamente com a cardite, aparecem nódulos subcutâneos, firmes e indolores, que normalmente se localizam nas extremidades, próximos às áreas ósseas dos pés e das mãos (KONEMAN et al, 2008).

A coréia (Coréia de Sydenhan) é uma manifestação neurológica caracterizada por espasmos musculares, falta de coordenação e fraqueza muscular, que surgem durante a FR ou depois de vários meses. Esses ataques de FR geralmente duram 3 a 6 meses (KONEMAN et al, 2008).

Entre as diversas doenças reumáticas, a FR talvez seja o maior desafio diagnóstico, pois ainda não existe um teste laboratorial específico para diagnosticar a doença. As manifestações clínicas e valores alterados em testes laboratoriais não são exclusivos da FR e nem sempre a infecção estreptocócica causadora fica evidente. Tal dificuldade leva a falsos diagnósticos e ao não diagnóstico de formas incomuns (SILVA, [20-]). Para evitar diagnósticos equivocados, são empregados desde 1944 os Critérios de Jones, que constantemente passam revisões (SILVA, [20-]). Os Critérios de Jones são utilizados apenas como um guia para o diagnóstico, uma vez que há outras doenças que podem preencher estes critérios, além de casos atípicos de doença reumática que podem não satisfazer esses critérios (OLIVEIRA; SILVA; VIJLE, 1997). De acordo com Silva ([20-]), estes critérios estabelecem que a alta probabilidade de FR é quando, além da evidência de infecção prévia na garganta pelo *S. pyogenes*, são detectadas dois critérios maiores ou um maior e dois menores, descritos a seguir:

Critérios maiores: Poliartrite (artrite em várias articulações), cardite, miocardite, pericardite, coréia de Sydenhan, eritema marginado e nódulos subcutâneos.

Critérios menores: Artralgia (dores articulares), febre baixa e precoce (< 39°), provas de atividades infamatórias elevadas como, por exemplo, a velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína C reativa (PCR), antecedentes de doença reumática, ocorrência progressiva de infecção estreptocócica, evidenciada por uma cultura positiva de material de garganta ou teste de antígeno direto positivo para *S. pyogenes*, ou por títulos elevados ou crescentes de anticorpos antiestreptocócicos (p.ex., ASLO, anti-DNaseB, anti-hialuronidase) (DAJANI, 1993 apud KONEMAN et al, 2008; OLIVEIRA; SILVA; VIJLE, 1997). A obtenção de um único teste positivo para anticorpo antiestreptocócico não é diagnóstico de FR, por esta razão se recomenda a realização de todos os três testes de anticorpos específicos se houver alta suspeita da doença (DAJANI, 1993 apud KONEMAN et al, 2008). Mas, estas características

são bastante inespecíficas, pois estão presentes na maioria das doenças inflamatórias, infecciosas e outras afecções constitucionais (OLIVEIRA; SILVA; VIJLE, 1997).

Uma história de FR anterior sugere um diagnóstico de recorrência na presença de outros sinais sugestivos, mas o diagnóstico é considerado presuntivo quando há coréia isolada ou cardite indolente (sem crise anterior) (SILVA, [20-]).

3.2.2 Glomerulonefrite

A glomerulonefrite (GN) é uma doença inflamatória do glomérulo renal e está associada a infecções faríngeas (faringoamidalite) ou cutâneas (piodermite) anteriores por *S. pyogenes* (KONEMAN et al, 2008). Segundo Murray et al (2000), esta doença está associada a cepas nefritogênicas específicas e, as cepas faríngeas se diferem das cepas encontradas na piodermite. Em geral, os pacientes jovens apresentam recuperação sem qualquer problema. Todavia, o prognóstico em longo prazo para pacientes adultos não está bem claro, podendo ser observada a perda progressiva e irreversível da função renal. Como a FR, trata-se também de uma doença de natureza imunológica (TRABULSI et al, 2002). A GN pode ser observada dentro de apenas 10 dias após a faringite ou 3 a 6 semanas após as infecções cutâneas (ANTHONY et al, 1969 apud KONEMAN et al, 2008). Em geral, pode-se demonstrar uma infecção antecedente por *S. pyogenes* devido ao isolamento de microrganismos da garganta ou de lesões cutâneas, ou devido à elevação dos títulos de anticorpos antiestreptocócicos. As respostas de ASLO após infecções cutâneas estreptocócicas não estão confiavelmente aumentadas (BISNO, 2000 apud KONEMAN et al, 2008).

Entre vários estudos, a teoria mais convincente é a de que os estreptococos induzem a formação de anticorpos antiestreptocócicos contra antígenos capsulares (ácido hialurônico), da parede celular (anticarboidratos de grupo, anti-M e outras proteínas associadas) e antígenos de membrana celular que exibem reação cruzada com diversos componentes antigênicos nos tecidos cardíacos, músculo esquelético e articulações. Embora se tenha demonstrado a ocorrência de reações cruzadas entre cepas nefritogênicas de estreptococos e tecidos renais, as anormalidades patológicas da nefrite podem, na realidade, ser devidas ao depósito de imunocomplexos pré-formados, que contêm antígenos estreptocócicos e anticorpos do hospedeiro nos tecidos glomerulares, ou à ligação renal de produtos estreptocócicos após

deposição de anticorpos, produzindo imunocomplexos (BISNO et al, 1978; GORONCY-BERMES et al, 1987; HOLM et al, 2000; TUNG et al, 1978; VAN et al, 1978 apud KONEMAN et al, 2008).

SISTEMA DE BIBLIOTECAS
FEPEMIG
BIBLIOTECA MONSENHOR DOMINGOS PRADO FONSECA

4 ANTIESTREPTOLISINA “O” (ASLO)

Streptococcus pyogenes produz duas hemolisinas, O e S. Ambas hemolíticas, mas somente a hemolisina “O” estimula o desenvolvimento de anticorpos específicos, a antiestreptolisina “O”. Esses anticorpos são produzidos pelo nosso organismo para combater o estreptococo durante ou logo após uma infecção de garganta (MOURA et al, 2006)².

Pacientes com doença por *S. pyogenes*, produzem anticorpos contra várias enzimas específicas do nosso organismo (BENTHIEN, 2002), podendo levar a sequelas como, por exemplo, a febre reumática (FR). Os pacientes com FR frequentemente produzem uma resposta imune humoral à estreptolisina “O” (RCL COMERCIAL, 2002). As maiores dificuldades do diagnóstico decorrem principalmente da inexistência de sinais patognomônicos e de exames laboratoriais específicos. O teste usado para medir os níveis de anticorpos contra esta hemolisina é denominado ASLO (KONEMAN et al, 2008; RCL COMERCIAL, 2002).

Segundo Moura (2006), o título de anticorpos antiestreptolisina “O” (ASLO ou ASO) pode ter valor diagnóstico em casos de pacientes que estão ou esteve há pouco tempo com infecção estreptocócica. Como são comuns infecções por este patógeno, na maioria dos indivíduos, a presença desses anticorpos, quando em pequenos títulos, não pode ser considerada, mas em títulos altos ou o aumento de títulos em dosagens seriadas são significativos. Um título elevado de ASLO em indivíduos com sintomas clínicos apropriados reforça, por exemplo, o diagnóstico de FR. Esta dosagem é muito útil para documentar, portanto, recente faringite estreptocócica em um paciente com FR (RCL COMERCIAL, 2002).

Títulos elevados ou ascensão do título entre duas amostras indicam infecção aguda ou sequela pós-estreptocócica. Títulos elevados são observados em 80 - 85% dos pacientes com FR. Os títulos se elevam uma semana após a infecção aguda, alcançando o pico em 2 a 4 semanas e se normalizam após 6 a 12 meses. O valor de referência ou *Cut off* da ASLO é ≥ 200 UI/mL, quando os títulos são menores que 200 UI/mL e existe forte suspeita de FR, é recomendável nova titulação em amostra colhida 4 semanas após a primeira (CAMPOS, 2003).

² A antiestreptolisina “O” foi descrita com maior ênfase, devido a sua relevância nesta pesquisa.

De acordo com Cartaxo ([2000?]) a solicitação do exame laboratorial ASLO é o mais comum entre as várias especialidades médicas como, por exemplo, os cardiologistas, reumatologistas e imunologistas para o diagnóstico laboratorial da FR, porém são necessárias algumas considerações com relação ao resultado e a sua interpretação:

- Valores normais do ASLO variam com a idade do indivíduo.
- O exame ASLO não expressa a atividade de doença.
- Não há relação direta entre elevação e normalização dos títulos do ASLO com a gravidade da FR.
- Há possibilidade de o ASLO manter-se elevado por um determinado período de tempo (até meses), sem causa aparente, mesmo com provas de atividade inflamatória normalizada.
- A precoce instituição de antibióticos e corticóides de 2 a 14 dias após a infecção por estreptococos podem diminuir a resposta imunológica do indivíduo, apresentando baixos títulos de ASLO.
- A titulação do ASLO deve ser precedida da precipitação de inibidores ligados às beta-lipoproteínas do soro, podendo levar a um título falsamente elevado do ASLO em indivíduos reumáticos ou não.
- A elevação do título do ASLO representa apenas uma resposta a uma prévia infecção estreptocócica e a sua elevação não indica em absoluto o diagnóstico da FR, portanto, títulos elevados de ASLO significam infecção estreptocócica recente e não FR.

Com o conhecimento destes dados, evita-se o falso diagnóstico de FR e, assim, o uso indiscriminado, confuso e continuado de medicamentos.

4.1 Reação do látex

Em 1932, Todd verificou que a estreptolisina “O” (SLO), obtida de filtrados de estreptococos hemolíticos, comportava-se como antígeno e poderia ser utilizada para titular a ASLO no soro de animais imunizados (TODD, 1932a; TODD, 1932b apud FERREIRA, 2001). A partir de então foram desenvolvidos testes para a detecção de anticorpos ASLO (FERREIRA, 2001).

Dentre estes testes está a reação de látex, um teste rápido de aglutinação para a detecção da ASLO no soro humano (LABORATÓRIO BÚRIGO, 2007). Este teste é baseado na capacidade de estreptococo β -hemolítico do grupo A produzirem várias toxinas extracelulares que estimulam a produção de anticorpos (RCL COMERCIAL, 2002), sendo estes, portanto encontrados em soros de pacientes portadores deste patógeno (LABORATÓRIO BÚRIGO, 2007). Um *Kit* imunológico é composto por partículas de látex sensibilizadas por SLO que ao adicionar o soro do paciente contendo ASLO ocorre uma reação de aglutinação (figura 02).

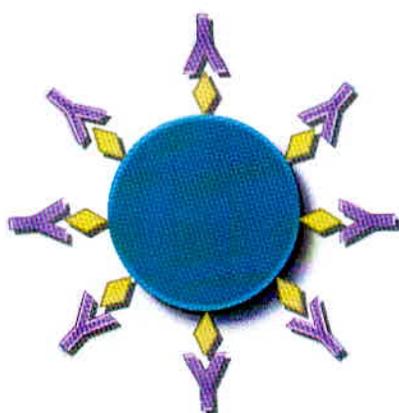


Figura 02 – Aglutinação. Representação de uma aglutinação em látex devido à formação de imunocomplexo Ag–Ac.

Há diversos reagentes comerciais desenvolvidos no mercado, com diferentes eficiências diagnósticas (FERREIRA, 2001). A SLO é fortemente antigênica, conseqüentemente pacientes infectados produzem anticorpos específicos detectáveis pelo reagente (LABORATÓRIO BÚRIGO, 2007).

A reação de látex para a pesquisa de anticorpos ASLO tem sido proposta como alternativa para triagem de casos suspeitos (FERREIRA, 2001). Este reagente demonstrou uma boa eficiência diagnóstica, onde apresentou uma sensibilidade de 91%, especificidade de 86%, valor preditivo positivo de 83% e o valor preditivo negativo de 93% (GERBER, 1990 apud FERREIRA, 2001).

A literatura tem se mostrado otimista com o reagente de látex quando comparado a outras técnicas e a conclusão de vários autores é que, no futuro, poderão ser desenvolvidos reagentes de látex para a detecção de múltiplos anticorpos, uma vez que as partículas de látex poderiam ser sensibilizadas com diferentes antígenos de *S. pyogenes* (GERBER, 1990 apud FERREIRA, 2001).

5 PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE

A produção de antissoro hiperimune é utilizada para o diagnóstico de uma variedade de infecções. A produção deste pode ser através de imunizações em animais e tem sido utilizada com sucesso por diversos profissionais imunologistas, sendo possível a obtenção de anticorpos monoclonais ou policlonais, dependendo do grau de pureza do soro que se deseja.

Os anticorpos policlonais são obtidos através da purificação de todos os anticorpos presentes no sangue do animal, sendo que, o anticorpo contra o antígeno previamente inoculado é predominante. Se o objetivo é produzir anticorpos altamente específicos, o antígeno deve ser purificado até atingir a homogeneidade, mas também é possível utilizar uma mistura de diferentes antígenos em uma única imunização e obter anticorpos para todos (PAIVA; FIGUEIREDO; PAIVA, 2003).

Segundo Harlow e Lane (1998), a escolha do animal, depende da quantidade de soro que se quer produzir, da quantidade de antígeno existente, de qual espécie o antígeno foi isolado e do tipo de anticorpo que se deseja produzir (monoclonal ou policlonal).

O coelho é uma espécie muito usada, sendo geralmente a escolha para obtenção de anticorpos policlonais devido à conveniência do tamanho, facilidade de manuseio, vida relativamente longa (5 – 8 anos) e volume de anti-soro produzido (HANLY et al, 1995 apud LEAL, 2008). A quantidade de soro que se pode obter é de aproximadamente 40 ml por sangria (informação verbal)³.

Um fator de elevada importância, é que estes animais, individualmente, podem variar bastante na sua resposta imunológica a um determinado antígeno (CLAUSEM, 1988 apud RODRIGUES, 1998). Para evitar problemas de variação nas respostas entre os animais, recomenda-se a imunização de pelo menos dois animais, para qualquer antígeno (BALL et al, 1990 apud RODRIGUES, 1998).

O antígeno pode ser injetado via subcutânea ou via intramuscular, este último é realizado quando se deseja uma absorção mais lenta. Os primeiros anticorpos aparecem em torno do sétimo dia atingindo seu pico de produção no décimo dia. Mas a primeira resposta imunológica a um antígeno é geralmente fraca, exigindo mais de uma injeção de inoculação. A partir da segunda injeção, grandes quantidades de anticorpos são produzidas com picos de produção que perduram por duas a quatro semanas (HARLOW; LANE, 1998).

³ Informação fornecida pela Doutora Agda Andrade, pesquisadora do setor de imunologia da Indústria Biotécnica em Varginha, em março de 2009.

É preconizado que a adição de adjuvantes é importante, pois desta forma aumenta consideravelmente a resposta imunológica, contornando o problema de fraca imunogenicidade na pesquisa. Os adjuvantes são substâncias que ao serem adicionadas ou emulsificadas com um antígeno, potencializam a produção de anticorpos. Em geral, possuem duas finalidades diferentes: um composto por partículas inertes possui a finalidade de proteger o antígeno de uma rápida degradação pelo organismo do animal, e outro capaz de ativar a resposta imunológica a antígenos, induzindo pequenos granulomas. Como exemplo deste o Adjuvante Completo de Freund (CFA), composto por óleos e *Mycobacterium tuberculosis* inativados. O CFA é um dos imunomoduladores mais comumente utilizados (GONTIJO, 2005).

A hiperimunização de animais experimentais com CFA emulsionado com antígeno e administrado subcutaneamente, seguido de injeções de reforço, com intervalos de semanas ou meses entre elas, resulta em altos níveis circulantes de antígeno-anticorpo específico (BILLIAU; MATTHYS, 2001 apud GONTIJO, 2005) e a capacidade imunomodulatória do CFA na indução da resposta imunológica pode ser demonstrada em diversos estudos (KAHN; ARCHER; GOLD, 2001 apud GONTIJO, 2005).

5.1 O uso de controles no laboratório de análises clínicas

Os laboratórios clínicos (LC) produzem resultados analíticos que são úteis para o diagnóstico, prognóstico, controle do tratamento e prevenção de enfermidades, por isso todo laboratório deve dispor de um sistema que assegure a qualidade de seus resultados. O controle de qualidade é um conjunto de ações sistemáticas capazes de reconhecer e minimizar os erros que podem ocorrer nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. Esse sistema é composto por várias ferramentas como o uso dos materiais de controle.

Qualquer material usado para controlar a qualidade de um procedimento de medida é um material de controle. Por não possuir grau de incerteza definido, os materiais de controle não podem ser utilizados como calibrador, que possuem a finalidade de monitorar a precisão do sistema analítico.

No laboratório clínico o material de controle é usado para avaliar as características metrológicas de um procedimento de medida, para validar os resultados de uma série de

amostras e para estudar comparativamente os resultados de diferentes laboratórios. Podem ser compostos por uma matriz sintética (não protéica) ou protéica composta por fluidos biológicos devidamente estabilizados. Em geral, essa última é a preferida por sua similaridade com os espécimes de pacientes. Para garantir a sua utilidade no controle dos procedimentos de medida, os materiais de controle devem apresentar homogeneidade, estabilidade, reatividade e valor.

Os materiais de controle possuem valores médios esperados bem como a faixa de variação proposta pelo fabricante. A concentração do analito no controle deve estar próximo a faixa de referência clínica, embora o ideal é que se utilize controles com 3 níveis de concentração: baixo (nível 1), médio ou normal (nível 2) e elevado ou patológico (nível 3). O controle de nível 3 deve ser acima do limite superior do intervalo de normalidade, enquanto que o nível 1 deve ser abaixo do valor de referência. No caso do controle de ASLO encontra-se disponível no mercado controles compostos por nível 1 cujo valor de ASLO é de 90 UI/mL, nível 2 com valor de 254 UI/mL e nível 3 com valor superior a 350 UI/mL.



6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Aclimação dos animais

Antes de iniciados os experimentos, os coelhos permaneceram em período de aclimação de 15 dias no biotério do Centro Universitário do Sul de Minas (UNIS/MG). Este período foi essencial para que estes animais se adaptassem à temperatura, a iluminação, a umidade, as gaiolas, e aos tratadores. Todo esse procedimento se torna de extrema importância, a fim de se evitar algum tipo de stress nos coelhos, o que poderia levar a alterações relevantes aos resultados esperados na pesquisa.

6.2 Sequência das imunizações

O antígeno estreptolisina “O” utilizado nas imunizações foi gentilmente cedido pelo laboratório da USP de Ribeirão Preto.

Foram realizadas no total cinco imunizações através de injeções subcutâneas com intervalos de sete dias entre a primeira e a segunda imunização e com intervalos de três dias entre as subsequentes. Em cada inoculação foram utilizados diferentes volumes (ANEXO A) e injetado apenas 0,5 ml por sítio de aplicação, com a intenção de evitar a ocorrência de necrose na pele dos coelhos. Foi utilizada SLO ressuspensa em adjuvante completo de FREUND na primeira das injeções (para uma indução mais rápida da resposta imune) e incompleto nas demais (para aumentar ainda mais a resposta imune).

Os coelhos foram sangrados na artéria central da orelha antes da primeira inoculação, antes da quarta e sete dias após a quinta (última) inoculação. Ao final de todas as imunizações, foi realizada a extração de maior quantidade sanguínea, onde os coelhos anestesiados foram submetidos a uma punção venosa para extração de sangue correspondente a 15% do peso de cada animal, procedimento este realizado por uma médica veterinária.

6.3 Purificação do antissoro

O método convencional para obtenção de anticorpos policlonais é a purificação através de técnica de precipitação por sulfato de amônio (HARLOW; LANE, 1998), onde em altas forças iônicas, conseguidas pela adição de grandes quantidades desse sal hiperssolúvel a uma solução de proteína (soro), há a remoção da água de hidratação das moléculas, levando à predominância da interação proteína-proteína, resultando em precipitação. Este efeito é denominado de “salting-out” ou precipitação por sais (BASSO; BOGO, [20-]; FERNADEZ e ALVES, entre 1990 e 2008).

Para a realização desta técnica o soro obtido foi colocado em um erlenmeyer, onde foi adicionado sulfato de amônio (50%). Esta foi submetida à agitação magnética por um período aproximado de 24 horas, durante este período os anticorpos (IgG) foram precipitados pelo sal. Após esta precipitação a solução foi centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm reservando-se apenas o sedimento. Nos tubos contendo sedimento adicionou-se 50% do volume total de soro de salina, dessa forma na amostra da cobaia 01 colocou-se 4mL de salina e para amostra da cobaia 02 colocou-se 3mL de salina. Essa solução foi colocada dentro de uma membrana de nitrocelulose, foram dialisadas contra uma solução salina a 0,85% e submetidos à agitação magnética por 48 horas. Durante este período foram realizadas 8 trocas da solução salina a 0,85%. Após diálise, foi adicionado nas amostras 0,1% de Azida sódica como conservante e as mesmas foram armazenadas entre 2 a 8°C.

6.4 Testes de qualidade do antissoro

6.4.1 Avaliação da especificidade do antissoro

A técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose, também conhecida como técnica de Ouchterlony foi utilizada para avaliar a especificidade dos anticorpos purificados. Esta técnica se baseia na capacidade precipitante dos imunocomplexos formados, quando antígeno e anticorpo se difundem no gel de agarose e sofrem ligação cruzada. O imunocomplexo

apresenta-se sob a forma de linhas, bandas ou arcos de precipitação perpendiculares a linha do eixo entre os orifícios (ROITT; BRASTOFF; MALE, 2003).

De acordo com Ferreira (2001), a velocidade de difusão de cada substância em gel de agarose é regida pelas leis de difusão e é dependente da concentração e tamanho de cada molécula, tamanho dos poros do gel, temperatura, concentração do ágar e de sua pureza.

Foram utilizadas placas contendo gel de agarose a 1% contendo seis orifícios externos (onde se encontram os soros) e um central (onde se encontra o antígeno – SLO) (figura 03):

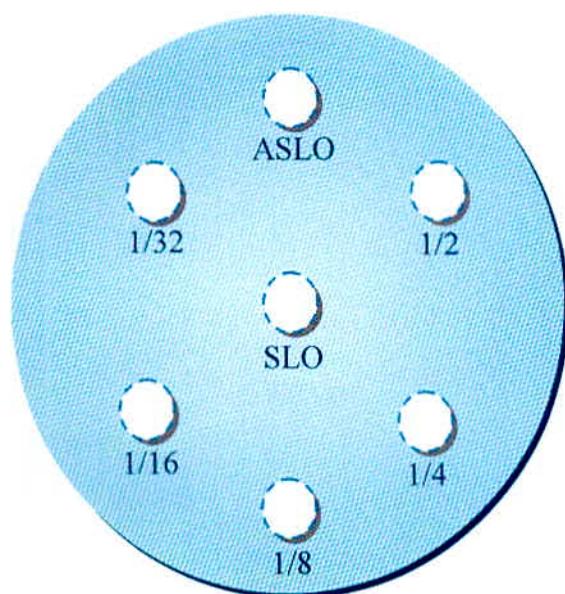


Figura 03 – Imunodifusão dupla. Esquema da disposição do antígeno (estreptolisina “O”) e do antissoro puro com suas respectivas diluições.

Estas placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas, em seguida foram mantidas em temperatura ambiente por mais 5 dias, uma vez que o aparecimento das bandas pode ser demorado.

6.4.2 Avaliação da concentração do antissoro

Para quantificar a ASLO *in vitro* produzida pelos animais, utilizou-se o procedimento analítico turbidimétrico, que é uma técnica imunológica automatizada. Esta técnica fundamenta-se na diminuição da luz transmitida, que é medida ao atravessar uma amostra em que ocorreu a reação antígeno-anticorpo (Ag-Ac), inclui-se entre os métodos de análise quantitativa de soluções coloidais ou de suspensões, baseado na medição da absorção de luz. Portanto, as partículas de látex recobertas com estreptolisina “O” presentes no reagente do *Kit*

foram aglutinadas por anticorpos antiestreptolisina “O” presente no soro dos animais, havendo a formação do complexo Ag-Ac insolúvel que provocou um acréscimo na turbidez proporcional à concentração dos anticorpos da amostra e por comparação com um calibrador de ASLO de concentração conhecida, foi possível a determinação do conteúdo destes anticorpos na amostra analisada.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 Controle negativo

A coleta antes da inoculação do antígeno serviu como controle negativo, demonstrando que os coelhos não teriam uma infecção recente com o *S. pyogenes* antes da primeira inoculação. Desta forma, o soro obtido foi submetido a testes imunológicos, apresentando ausência de resposta imunológica. Posteriormente a amostra foi armazenada a -20°C.

7.2 Imunodifusão dupla (ID)

Como desvantagem, esta técnica exige maior quantidade de imunocomplexos (Ag-Ac) para ocorrer à reação, pois é uma técnica considerada muito específica e pouco sensível. Como a resposta dos animais foram baixas, a reação na ID foi negativa, não havendo formação das linhas de precipitação nas placas (figura 04). Desta forma, não foi possível a confirmação da especificidade Ag-Ac por esta técnica na pesquisa em questão e por isso, recorreremos à técnica de turbidimetria por ser mais sensível e automatizada.

A não precipitação pode ser devido à qualidade do antígeno, perda da atividade da SLO, uma vez que esta enzima é muito sensível na presença de oxigênio, resposta inadequada dos animais ou amostra hemolisada.

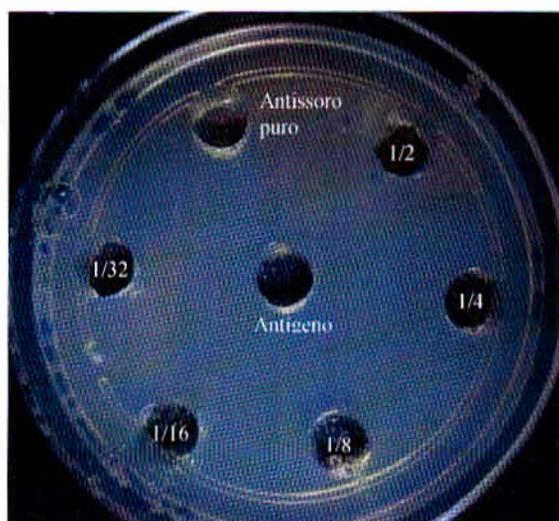


Figura 04 – Placa de imunodifusão. A ausência das linhas de precipitação, não permitiu confirmação da especificidade antígeno-anticorpo por esta técnica nesta pesquisa.

7.3 Turbidimetria

A análise do soro após a quinta inoculação revelou um resultado de 14,4 UI/mL (cobaia 01) e 19.1 UI/mL (cobaia 02), confirmando a resposta imunológica dos animais contra a ASLO, sendo possível dosá-los através desta técnica (figura 05).

COBAS MIRA	
BIOTECNICA - CQ - 03 P0102	
PATIENT RESULTS <i>hemolizada</i>	
46 ID: P	
ASOB	14.4 IU/ml
ASOB	8.2 IU/ml
26-MAY-09 / 14:10	
COBAS MIRA	
BIOTECNICA - CQ - 03 P0102	
PATIENT RESULTS	
47 ID: B	
ASOB	4.7 IU/ml
ASOB	19.1 IU/ml
ASOB	17.1 IU/ml
26-MAY-09 / 14:14	

Figura 05 - Turbidimetria. Resultado da concentração de ASLO da amostra final das coabaia, feito pela técnica de turbidimetria.

CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que houve resposta imunológica dos animais, porém com títulos baixos. A antiestreptolisina “O” obtida pode ser usada como controle de nível baixo, permitindo a sua utilização em testes de detecção de anticorpos (ASLO) para diagnóstico rápido de uma infecção recente causada pelo *Streptococcus pyogenes* e o estado evolutivo da doença. Desta forma, com a associação do diagnóstico clínico e laboratorial, a indicação precoce de tratamento específico adequado, torna possível a cura da infecção, prevenção das complicações supurativas e não supurativas, erradicação do microrganismo da orofaringe e profilaxia do primeiro surto de febre reumática.

Infelizmente no mercado de diagnóstico *in vitro* no Brasil existe uma carência enorme de fabricantes de *kits* destinados aos testes imunológicos, pois os que existem são de fornecedores estrangeiros e de alto custo, além das taxas de importação, frete e remessa de divisas para fora do país. Diante do exposto, a produção de anticorpos anti SLO no presente trabalho vem corroborar com essas questões, uma vez que tais anticorpos são usados na fabricação de controles e calibradores que compõem um *kit* imunológico, bem como no controle de qualidade de um teste imunológico.

Desta forma, percebe-se através dos resultados obtidos, que novas inoculações devem ser realizadas, para obtenção de títulos de ASLO mais elevados como os níveis 2 e 3 mencionados nesta pesquisa. Mas, diante do prazo estabelecido para o encerramento da pesquisa e ausência de mais estreptolisina “O”, o trabalho foi concluído mesmo assim.

REFERÊNCIAS

- BENTHIEN, V. **Estudo e prevenção da febre reumática em escolares da rede municipal de ensino em campo largo – PR.** Campo Largo, PR: [s.n.], 2002. Disponível em: <<http://www.proec.ufpr.br/enec/download/pdf/3ENEC/saude/ESTUDO%20E%20PREVEN%C7%C3O%20DA%20FEBRE%20REUM%C1TICA%20EM%20ESCOLARES%20DA%20REDE%20MUNICIPAL%20DE%20ENSINO%20EM%20CAMPO%20LARGO-PARAN%C1.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2008.
- BOGO, M.; BASSO, L. A. **Reações de precipitação de proteínas.** Rio Grande do Sul: Faculdade de biociências, [20-]. Disponível em: <http://www.puers.br/fabio/bioquimica1/index_arquivos/MatSup_bioquimica/rea_prec_prot.doc>. Acesso em: 20 de jun. 2009.
- CAMPOS, S. de. **Anti estreptolisina “O”.** [S. l.: s. n.], 2003. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/7761>>. Acesso em: 09 fev. 2009.
- CARTAXO, S. **Febre reumática e ASLO.** João Pessoa: UNIMED, [2000?]. Disponível em: <<http://www.unimedjp.com.br/canais/saudeebemestar/informacoes/ver-consultorio-medico.php?id=95>>. Acesso em: 11 jan. 2009.
- DOENÇAS do homem causadas por bactérias: estreptococcias. Universidade Federal do estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Instituto Biomédico, 2008. p. 16. Disponível em: <<http://www.unirio.br/dmp/Graduacao/Nutricao/Microbiologia/Estreptococcias.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2009.
- FERNANDEZ, L. G.; ALVES, S. **Caracterização de aminoácidos e proteínas.** Salvador: UFB/ Instituto de Ciências da Saúde. Entre 1990 e 2008. Disponível em: <<http://saulo.alvesnet.net/ufba/04%20-%20P%20%20Caracterizacao%20Aminoacidos%20e%20Proteinas.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2008.
- FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial:** avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-ímmunes- correlação clínico-laboratorial. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GONTIJO, B. A. **Avaliação dos efeitos da leptina em células esplênicas de camundongos nod (diabético não obeso) e balb-c. estudos da influência da pré- estimulação com adjuvante completo de Freund.** 2005. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005. Disponível em: <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000401021>>. Acesso em: 14 mar. 2009.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

KONEMAN, E. W. et al. Cocos Gram-positivos – parte II: estreptococos, enterococos e bactérias “semelhantes a estreptococo”. In: _____ **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 13, p. 667-676; 703-713.

LABORATÓRIO BÚRIGO. **Exame: Anti-estreptolisina "o".**[S. l.]: [s. n.], 2007. Disponível em: <<http://www.laboratorioburigo.com.br/exames/1/ASO>>. Acesso em: 09 fev. 2009.

LEAL, L. M. et al. Produção de anticorpo policlonal anti-leptospira. CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA – CONBRAVET, 35., 2008, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul – SOVERGS, 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0419-3.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2009.

MOURA, R. A. et al. **Técnicas de Laboratório.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 301.

MURRAY, P. R. et al. *Streptococcus.* In: _____ **Microbiologia médica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 23, p. 158-164.

NOSCHANG, J. **Variabilidade genética de isolados de *Streptococcus pyogenes* por meio de marcadores RAPD.** 2006. 51f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/7603/1/Tese_JulianaNoschang.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2009.

OLIVEIRA, J. J.; SILVA, S. R. A. S.; VIJLE, J. D. Doença reumática. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia,** São Paulo, v. 69, n. 1, p. 69-77, jul. 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X1997000700013>. Acesso em: 05 nov. 2008.

PAIVA, E.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PAIVA, L. V. **Técnicas imunológicas.** Lavras: UFLA/FAEPE. 2003.

PRESTES-CARNEIRO, L. E.; ACÊNCIO, E. S. L.; POMPEI, A. C. S. Determinação de anti-estreptolisina "O" e proteína C reativa entre escolares do município de Laranjal, PR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 1, p. 67-68, jan./fev. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822005000100015&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 02 abr. 2008.

RCL COMERCIAL. **Caso clínico número 17**. Sorocaba: [s. n.], 2002. Disponível em: <<http://www.rclcomercial.com.br/resp17.htm>>. Acesso em: 27 mar. 2009.

REISNER, B. S.; WOODS, G. L. Bactérias de importância clínica. In: HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. ed. Barueri: Manole, 2008. Cap. 50, p. 1258-1261.

RODRIGUES, P. C. A. **Produção e caracterização de um antissoro policlonal para detecção de ds-RNA**. Vila Real/ Portugal: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1998. Disponível em: <<https://bibliotecadigital.ipb.pt/dspace/bitstream/10198/997/1/Relat&Teses.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2009.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. Barueri: Manole, 2003, p. 283, 284, 417, 418 e 423.

SCALABRIN, R. et al. Isolamento de *Streptococcus pyogenes* em indivíduos com faringoamigdalite e teste de susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, vol. 69, n. 6, p. 814-818, nov/dez. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-72992003000600014&script=sci_arttext>. Acesso em: 04 fev. 2009. p. 814 – 818.

SILVA, N. A. **Febre reumática**. [S.l.: s.n.], [20--]. Disponível em: <http://www.emedix.com.br/doe/reu010_1f_febreumatica.php>. Acesso em: 25 out. 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA – SBR. **Febre reumática**. São Paulo: SBR, 2005. Disponível em: <<http://www.reumatologia.com.br/index.asp?Pagina=reumatologia/principaisDoencasEorientacoesPacienteResultados.asp&IDPrincipalDoencaIDOrientacaoPaciente=OP;4>>. Acesso em: 30 out. 2008.

STREPTOCOCCUS pyogenes. São Paulo. [s. n.], [2000?]. 3 p. Disponível em: <<http://icb.usp.br/~bmm/materiais/Streptococcus%20pyogenes.doc>>. Acesso em: 04 de fev. 2009.

TRABULSI, L. R. et al. *Streptococcus e Enterococcus* In: _____ **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. Cap. 19, p. 157-164.

VIEIRA, F. M. J. et al. Prevalência de *Streptococcus pyogenes* em orofaringe de crianças que freqüentam creches: estudo comparativo entre diferentes regiões do país. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 587-591, set./out. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992006000500003&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 04 fev. 2008.

ANEXO A – VOLUMES ADOTADOS NA IMUNIZAÇÃO

	Suspensão de antígeno	Adjuvante de Freund	Volume total
1ª Inoculação	0,5 ml	0,5 ml (completo)	1,0 ml
2ª Inoculação	0,5 ml	0,5 ml (incompleto)	1,0 ml
3ª Inoculação	0,5 ml	0,5 ml (incompleto)	1,0 ml
4ª Inoculação	0,5 ml	0,5 ml (incompleto)	1,0 ml
5ª Inoculação	1,0 ml	1,0 ml (incompleto)	2,0 ml

SISTEMA DE BIBLIOTECAS
FEPESMIG
BIBLIOTECA MONSENHOR DOMINGOS PRADO FONSECA

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA

PARECER N.º 20A/2008

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP, da UNIFENAS, Setor de Experimentação Animal, tendo analisado, nesta data, o protocolo do projeto de pesquisa intitulado, **PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE ANTI ESTREPTOLISINA “O”**, de autoria da. Profa. Dra Agda Andrade, resolveu enquadrá-lo na categoria de aprovado.

Alfenas, 11 de novembro de 2008.


Profª Helena Engel Velano
Coordenadora do CEP



Data para apresentação do relatório final: 01/12/09

Modelo do Relatório Final e Parcial: <http://www.unifenas.br/pesquisa/>