



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**NOVA**

MEDICAL  
SCHOOL  
FACULDADE  
DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA



DESDE 1902  
INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

# **Determinação do estado imunitário para a rubéola numa população feminina com IgG duvidosa ou negativa**

**Sara Isabel Margarido Costa**

Dissertação para obtenção do  
**Grau de Mestre em Microbiologia Médica**

**Outubro 2019**



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**NOVA**

MEDICAL  
SCHOOL  
FACULDADE  
DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA



DESDE 1902  
INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

# **Determinação do estado imunitário para a rubéola numa população feminina com IgG duvidosa ou negativa**

**Sara Isabel Margarido Costa**

Dissertação para obtenção do  
**Grau de Mestre em Microbiologia Médica**

Orientadores:

Professor Doutor Paulo Paixão

(NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas- Universidade Nova de Lisboa)

Doutora Maria de Jesus Chasqueira

(NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas- Universidade Nova de Lisboa)

NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas  
Unidade de infeção: Etiologia, Patogénese e Bases Terapêuticas

**Outubro 2019**

## **Agradecimentos**

Antes de mais, agradecer à equipa da Unidade de “Infeção: etiologia, patogénese e bases terapêuticas” da Nova Medical School- Faculdade Ciências Médicas por me terem acolhido e por, apesar de todas as contrariedades, não terem desistido de mim.

Agradecer ao meu orientador Prof. Doutor Paulo Paixão pelo apoio, orientação, sabedoria e disponibilidade sempre demonstrada.

À minha coorientadora, Doutora Maria de Jesus Chasqueira pela compreensão, rigor, disponibilidade e pelos seus ensinamentos ao longo deste percurso.

À Dra. Augusta Marques e Dra. Lúcia Rodrigues por todas as palavras de apoio durante esta fase.

Agradecer à equipa do Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, especialmente à Prof<sup>a</sup> Doutora Maria José Sousa Xavier, Dra. Margarida Albuquerque e Dra. Rita Ribeiro.

Aos meus pais, João Marques e Maria Júlia, por todo o apoio e compreensão nos momentos mais difíceis, por viverem diariamente na minha ausência e principalmente por sempre acreditarem que eu seria capaz.

Aos meus padrinhos, Joaquim e Conceição, por me acolherem como sua filha, pela paciência e por todo o apoio.

Aos meus irmãos e sobrinhos, que apesar das saudades, fazem com que seja tudo mais fácil.

Ao Manuel, por se ter tornado tão importante nestes últimos dois anos, por estar sempre presente, pela paciência e compreensão e por nunca me ter deixado desistir.

Aos meus amigos, por todo o apoio e por nos momentos mais difíceis terem sempre uma palavra de apoio.

Chegar ao fim deste percurso académico representa um longo caminho e um importante marco da minha vida pessoal e académica. Tudo isto só foi possível graças a todos eles, que fazem com que a minha vida seja muito mais feliz.

## Resumo

A rubéola é uma doença viral muitas vezes assintomática, no entanto, torna-se particularmente grave se a infecção ocorrer durante a gravidez, principalmente no 1º trimestre, podendo originar a tríade clássica de cataratas, anomalias cardíacas e surdez neurossensorial ou resultar em morte prematura.

A determinação do estado imunitário para o vírus da rubéola é atualmente efetuada por imunoenaios comerciais que determinam a concentração da IgG específica. No entanto, e apesar dos testes disponíveis se encontrarem calibrados com o Padrão Internacional da OMS e os resultados serem dados em UI/mL, estes podem diferir e levar a interpretações incorretas.

No presente trabalho foi utilizada técnica de *Immunoblot* (IB) para analisar 146 amostras previamente analisadas por dois imunoenaios comerciais no CMLGS e cujos resultados tinham sido negativos ou equívocos.

Os resultados obtidos mostraram que na maioria (81%) das mulheres foram detetadas IgG para o vírus da rubéola, ao contrário do que tinha acontecido com os imunoenaios comerciais. As 24 amostras que foram negativas no IB também tinham sido nos dois imunoenaios comerciais.

Analisando as duas variáveis, resultados obtidos com o IB e respostas sobre o estado vacinal, verificou-se a existência de uma correlação, estatisticamente significativa, dado que se observou que a maioria das mulheres com IB positivo tinham sido previamente vacinadas. Apenas num caso uma mulher afirmou estar vacinada, tendo o IB sido negativo.

Os nossos resultados demonstram que a realização do IB pode diminuir substancialmente o número de resultados falsamente negativos sobre o estado imunitário para a rubéola na população feminina e as consequentes revacinações.

A aplicação do IB em casos selecionados, nomeadamente nos casos em que o estado vacinal é desconhecido e que os testes de rotina foram negativos ou equívocos, deverá ser um assunto de discussão alargado e multidisciplinar, envolvendo as autoridades de saúde.

**Palavras-chave:** rubéola, *immunoblot*, imunoenaios comerciais, IgG da rubéola, vacinação.

## **Abstract**

Rubella is a viral disease which, most of the times, is asymptomatic. However, when the infection occurs during pregnancy, especially during the 1<sup>st</sup> trimester, it may lead to the classical triad of symptoms: cataracts, cardiac anomalies and deafness. In worse cases it may also lead to premature death.

Currently, the way to ascertain the immune response for the rubella virus is by using commercial immunoassays that determine the concentration of rubella IgG. However, although the available tests are calibrated to the WHO International Standard and the results are given in IU/mL, these can differ and lead to wrong interpretations.

In this study, IB was used in order to compare the results of 146 samples previously analysed, in CMLGS, by the commercial immunoassays and whose results were either negative or equivocal.

The results showed that the majority (81%) of the analysed women were immune to rubella virus, contrary to the results of the commercial immunoassays. The 24 negative samples were proven negative in both types of tests.

By comparing the two variables, the results of the IB and the response to the vaccination status, it was possible to infer that there is a correlation between them, as most women with positive IB were previously vaccinated (only 1 woman said she was vaccinated and had a negative IB).

Our results demonstrated that using IB can substantially diminish the number of false negatives about the immune state for rubella in the female population and subsequent revaccinations.

The use of IB in select cases, especially cases where the vaccination status is unknown and the routine tests were negative or questionable, should be a point of a large and multidisciplinary discussion, involving the health authorities.

**Keywords:** rubella, *immunoblot*, commercial immunoassays, rubella IgG, vaccination.

## **Lista de abreviaturas e siglas**

**ARN** Ácido Ribonucleico

**CMLGS** Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa

**DGS** Direção Geral de Saúde

**EUA** Estados Unidos da América

**HAI** Teste de inibição de hemaglutinação/hemaglutinina

**Ig** Imunoglobulina

**IB** *immunoblot*

**IRC** Infecção por rubéola congénita

**NMS-FCM** Nova Medical School | Faculdade de Ciências Médicas

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**PCR** *Polymerase Chain Reaction*

**PNV** Plano Nacional Vacinação

**SDS-PAGE** *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

**SRC** Síndrome da Rubéola Congénita

**TN** Teste de Neutralização

**UE** União Europeia

**UI** Unidades internacionais

**UI/mL** Unidades internacionais por mililitro

**VASPR** Vacina combinada trivalente contra o sarampo, a parotidite epidémica e a rubéola

**VCR** Vacinação contra a rubéola

## Índice

1	Introdução .....	1
1.1	Contextualização histórica.....	1
1.2	Classificação e estrutura do vírus .....	1
1.3	Transmissão .....	3
1.4	Manifestações clínicas .....	4
1.5	Tratamento .....	5
1.6	Epidemiologia .....	5
1.7	Erradicação e Prevenção .....	8
1.7.1	Vacinação.....	9
1.8	Diagnóstico laboratorial .....	12
1.8.1	Determinação do estado de infeção .....	12
1.8.2	Determinação do estado imunitário para a rubéola .....	13
1.8.2.1	Padrão internacional .....	13
1.8.2.2	Teste de Neutralização .....	14
1.8.2.3	Teste de inibição da hemaglutinação .....	15
1.8.2.4	Imunoensaios comerciais .....	15
1.8.2.5	<i>Immunoblot</i> .....	16
2	Objetivos.....	18
3	Material e métodos .....	19
3.1	População em estudo .....	19
3.2	Amostras clínicas .....	19
3.3	Metodologia utilizada na determinação de anticorpos IgG .....	19
3.3.1	<i>recomBlot</i> Rubella IgG .....	19
3.3.1.1	Reagentes .....	20
3.3.1.2	Procedimento .....	20
3.3.1.3	Validação dos resultados.....	22

3.3.1.4	Interpretação dos resultados .....	22
3.4	Análise estatística .....	22
4	Resultados e Discussão.....	24
4.1	População em estudo .....	24
4.2	Determinação do estado imunitário para o vírus da rubéola .....	24
4.2.1	Imunoensaios comerciais (avaliação realizada pelo CMLGS).....	24
4.2.2	<i>Immunoblot</i> .....	25
4.3	Comparação dos resultados entre imunoensaios comerciais e <i>immunoblot</i> .....	27
4.4	Controlos positivos .....	33
4.5	Vacinação.....	33
4.6	Custos .....	38
5	Conclusão e perspetivas futuras.....	40
6	Bibliografia.....	42
Anexos	.....	47

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da estrutura do vírus da rubéola. ....	2
<b>Figura 2.</b> Relação entre características clínicas, virológicas e imunológicas na infeção por rubéola.....	3
<b>Figura 3.</b> Dados sobre a incidência da SRC em 2010.....	7
<b>Figura 4.</b> Número de casos notificados de rubéola, Portugal, 1987-2015.....	7
<b>Figura 5.</b> Número de casos notificados de Rubéola Congénita, por ano de notificação, Portugal.....	8
<b>Figura 6.</b> Programa Nacional de Vacinação atual, Portugal, 2019 .....	10
<b>Figura 7.</b> Mapa dos países que possuíam, em 2016, estratégias de vacinação contra a rubéola .....	11
<b>Figura 8.</b> Componentes do <i>kit recomBlot IgG</i> .....	20
<b>Figura 9.</b> Esquema do procedimento do teste <i>recomBlot Rubella IgG</i> .....	21
<b>Figura 10.</b> Tira de controlo pré-eluída.....	22
<b>Figura 11.</b> Distribuição da população em estudo por idades.....	24
<b>Figura 12.</b> Resultados do imunoensaio comercial <i>Liaison® Rubella IgG</i> , realizado no CMLGS. ....	25
<b>Figura 13.</b> Resultados do imunoensaio comercial <i>VIDAS® RUB IgG II</i> , realizado no CMLGS.....	25
<b>Figura 14.</b> Resultados obtidos com o teste <i>IB recomBlot Rubella IgG</i> .....	26
<b>Figura 15.</b> Comparação dos resultados obtidos nas 146 amostras analisadas por IB utilizando os critérios descritos pela equipa de Vauloup-Fellous (critérios A) e pela equipa de Panning (critérios B).....	27
<b>Figura 16.</b> Comparação dos resultados obtidos com IB e <i>LIAISON® Rubella IgG</i> .....	28
<b>Figura 17.</b> Comparação dos resultados obtidos com IB e <i>VIDAS® RUB IgG II</i> .....	29
<b>Figura 18.</b> Comparação dos resultados obtidos no IB e nos imunoensaios comerciais.....	30
<b>Figura 19.</b> Resultados obtidos nas quatro amostras positivas.....	33
<b>Figura 20.</b> Situação/estado vacinal da população em estudo.....	34

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Comparação dos resultados das amostras número 76 e 135 utilizando três testes convencionais para determinação do estado imunitário para o vírus da rubéola. ....	31
<b>Tabela 2.</b> Resultados equívocos com o <i>immunoblot</i> .....	31
<b>Tabela 3.</b> Diferenças entre imunoensaios comerciais.....	32
<b>Tabela 4.</b> Comparação entre resultados obtidos por IB e estado vacinal .....	34
<b>Tabela 5.</b> Distribuição da população em estudo de acordo com o plano de vacinação, os resultados do IB e dos imunoensaios comerciais.....	37

## 1 Introdução

### 1.1 Contextualização histórica

Descoberta no século XVIII, a rubéola foi inicialmente chamada de “terceira doença” por ser considerada uma variante do sarampo e da escarlatina. Em 1814 foi descrita pela literatura médica alemã como uma doença individualizada, ficando conhecida como sarampo alemão, mas só em 1866 foi atribuída a designação que persiste até hoje – Rubéola. Em 1914, com base no seu trabalho em macacos, Hess identificou a rubéola como uma doença viral. Mais tarde, em 1938, Hiro e Tosaka confirmaram essa etiologia, infectando crianças a partir de secreções nasais de casos agudos. Em 1941, foi relatada a associação entre catarata congênita e rubéola materna, sendo posteriormente confirmado o papel da rubéola no Síndrome da Rubéola Congênita (SRC) (1–3).

O vírus da rubéola foi isolado a partir de cultura de células pela primeira vez em 1962 por Parkman e Weller, durante a pandemia de rubéola que ocorreu entre 1962 e 1964. Neste período ocorreram cerca de 12,5 milhões de casos de rubéola, 20 000 casos de SRC e cerca de 11 000 óbitos. A gravidade desta situação desencadeou a necessidade de desenvolvimento de uma vacina (2,4,5).

Em 1969 foram licenciadas três vacinas vivas atenuadas contra a rubéola (HPV-77, Cendehill e RA27/3) (2,4). Dez anos mais tarde todas as vacinas licenciadas nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa foram substituídas por RA27/3 (6). Após a descoberta das vacinas alguns países adotaram programas de vacinação seletivos ou universais de forma a controlar a rubéola e a SRC. Em 2015 a América foi a primeira região a atingir a eliminação desta doença (7).

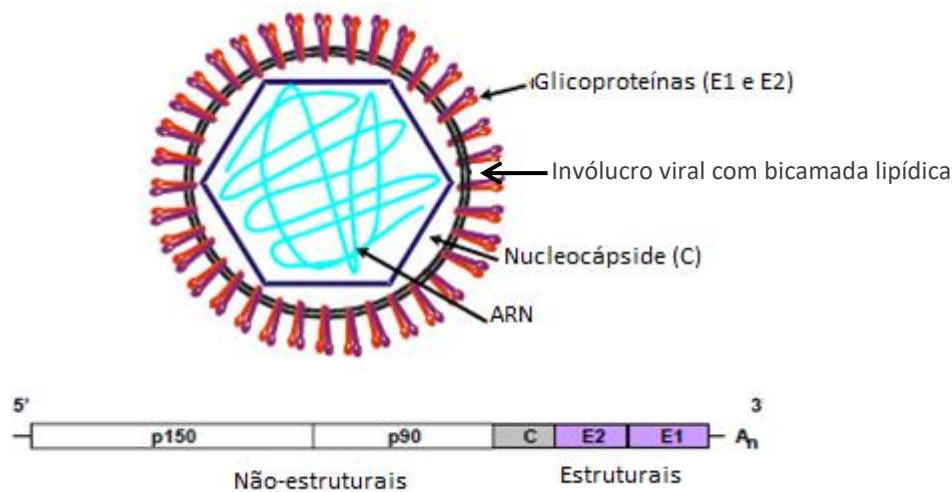
Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem estabelecido o ano de 2020 para eliminação da rubéola em pelo menos duas regiões (8).

### 1.2 Classificação e estrutura do vírus

O vírus da rubéola pertence à família *Togaviridae*, o único membro do género *Rubivirus* (9). Mas, ao contrário da maioria dos *Togavirus*, o vírus da rubéola infeta apenas humanos, não sendo suportado por artrópodes e não se conhecendo reação cruzada do vírus da rubéola com outros *Togavirus* (2,10).

A rubéola é um vírus esférico com um diâmetro entre 60 e 70nm com nucleocápside icosaédrica contendo um genoma de ácido ribonucleico (ARN) de cadeia simples com polaridade positiva e com 9762 nucleótidos, rodeado por invólucro lipídico (1,3,11). O vírus é constituído por um capsídeo composto por múltiplas cópias de uma proteína básica C (33kDa) e é envolvido por uma bicamada lipídica que incorpora as duas glicoproteínas do invólucro viral, E1 (58 kDa) e E2 (42-47kDa) (figura 1) (9,12). Estas duas proteínas

existem como heterodímeros projetados a partir da superfície e formando picos de 6 e 8nm, contendo hemaglutinina (3,10).



**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura do vírus da rubéola. [Adaptada] (3)

A proteína E1 é o antigénio imunodominante responsável pela endocitose (13). Encontra-se associada a epítomos neutralizantes e hemaglutinantes e tem reatividade imunogénica predominante em indivíduos expostos ao vírus por infeção natural, infeção congénita ou vacinação (3,10). A proteína E2 forma ligações entre proteínas E1 (13). A proteína C não é glicosilada e encontra-se associada ao ARN genómico 40S. As proteínas não estruturais (p90 e p150) estão envolvidas na replicação e transcrição do ARN mensageiro subgenómico, mas não são imunogénicas (10).

De forma a facilitar a vigilância virológica foi criado um sistema de nomenclatura que permite acomodar a descoberta de novos genótipos da rubéola e acompanhar a evolução do vírus. Isto permite ainda caracterização genética, nomeação do vírus e organização de sequências em genótipos reconhecidos e provisórios (14).

Neste momento, encontram-se descritos 12 genótipos reconhecidos (1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 2A, 2B, 2C) e 1 provisório (1a). Os números referem-se a grupos distantes de vírus designados *clade 1* e *clade 2* e as letras representam grupos de genótipos dentro dos *clades*, a letra minúscula representa genótipos provisórios (14). Apenas é conhecido um serotipo, no entanto este não demonstra reatividade com outros vírus (10).

Este é um vírus relativamente sensível à temperatura, mas mais estável ao calor do que o vírus do sarampo. É inativado após 30 minutos a 56°C, 4 minutos a 70°C e 2 minutos a 100°C. Degrada-se rapidamente a temperaturas de -20°C, mas é estável a -60°C e quando liofilizado com estabilizadores. Quando estabilizado com proteína, pode ser congelado e descongelado repetidas vezes. O vírus é inativado com solventes

lipídicos (éter, clorofórmio e acetona), ácidos fracos, luz ultravioleta, pH baixo, tripsina e ainda com ampla gama de desinfetantes como hipoclorito de sódio a 1%, etanol a 70% e formaldeído (2,3).

### 1.3 Transmissão

O vírus da rubéola é transmitido através de aerossóis, contato direto com pessoa infetada, objetos contaminados e através da placenta. Pode ocorrer também transmissão a partir do contato com urina de bebês com SRC, uma vez que o vírus é excretado em grande quantidade durante o primeiro ano de vida (3).

O período de incubação é de 14 dias, podendo variar entre 12 a 23 dias. Quando o vírus entra em contato com uma pessoa suscetível, este infeta a nasofaringe, replica-se no trato respiratório e dissemina-se para os gânglios linfáticos até chegar à corrente sanguínea. A virémia começa 5-7 dias após a exposição com disseminação para o resto do corpo, visível através da erupção cutânea. Esta é imunologicamente mediada e coincide com o desenvolvimento dos anticorpos anti-rubéola (figura 2). A rubéola é contagiosa essencialmente com o aparecimento da erupção, contudo o contágio pode ocorrer entre 1 semana antes a 5-7 dias após a erupção cutânea. No entanto, cerca de 50% dos casos de infecção são adquiridos a partir de casos subclínicos ou assintomáticos (2,3).

A infecção transplacentária ao feto ocorre durante a fase da virémia (1,2). Se esta ocorrer no primeiro trimestre de gravidez, resulta em cerca de 90% de fetos infetados e 100% dos infetados terão deformidades congênitas, podendo resultar em aborto espontâneo (10).

Como referido anteriormente, os sintomas clínicos nas crianças normalmente estão ausentes, no entanto os adultos podem desenvolver febre associada à virémia antes do início da erupção. Quando se desenvolve a resposta humoral, termina a fase de virémia e ocorre o aparecimento da erupção cutânea (figura 2) (1).

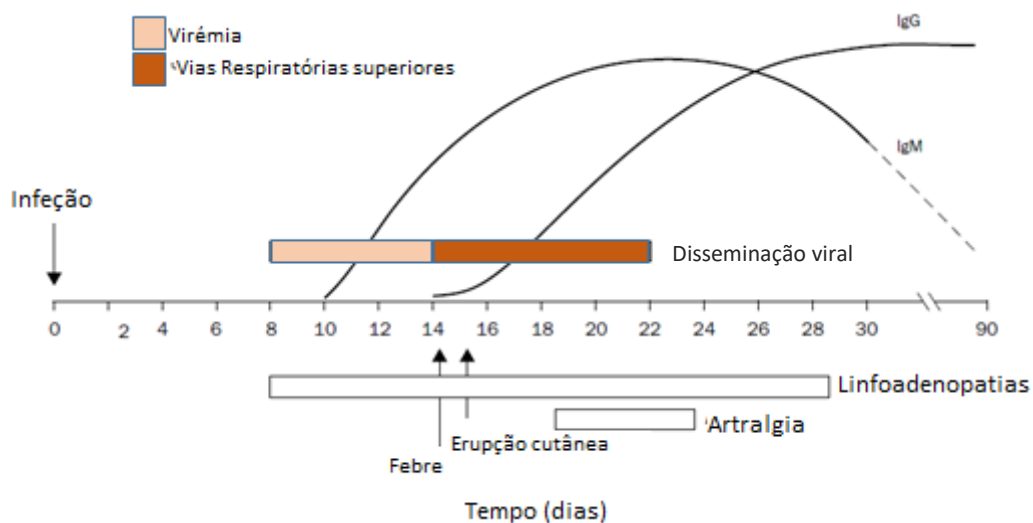


Figura 2. Relação entre características clínicas, virológicas e imunológicas na infecção por rubéola [adptada] (1)

## 1.4 Manifestações clínicas

A rubéola é uma doença viral que afeta principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens. É muitas vezes assintomática, mas quando surgem sintomas estes caracterizam-se por erupção cutânea, febre baixa, dores articulares, faringite e adenopatias cervicais. O aumento dos gânglios linfáticos ocorre 5-7 dias antes da erupção cutânea e até 2 dias depois. Apesar de não ser um sintoma específico, este pode ser mais pronunciado e perdurar por um maior período de tempo na rubéola do que noutras doenças, como por exemplo, o sarampo (3,11). Geralmente o primeiro sintoma a surgir nas crianças é a erupção cutânea, ao contrário do que acontece nos adolescentes e adultos jovens que 1 a 5 dias antes do aparecimento da erupção ocorre a fase prodrômica envolvendo febre baixa, dor de cabeça, mal-estar, conjuntivite, tosse, dor de garganta e linfadenopatias. A erupção maculopapular é menos evidente do que a erupção do sarampo, pode ser pruriginosa, iniciando-se normalmente no rosto e progredindo da cabeça para os pés, desaparecendo após 1-3 dias (2,3).

Podem ocorrer manifestações hemorrágicas (1 em 3 000) como púrpura trombocitopenia, hemorragia gastrointestinal, cerebral ou intra-renal, sendo mais frequente em crianças do que em adultos. Nas mulheres adultas, podem surgir complicações como artralgia ou artrite, podendo durar desde o início da erupção até um mês depois. Também surgem casos de encefalite (1 em 6 000), principalmente em adultos. Complicações adicionais podem ser orquite ou neurite (1,2).

A infeção pelo vírus da rubéola torna-se mais grave durante a gravidez. O tempo de gestação em que a infeção materna ocorre relaciona-se com a gravidade da infeção fetal. O primeiro trimestre é a fase em que ocorre a formação e desenvolvimento do embrião e a gravidade é maior devido ao elevado tropismo do vírus para os tecidos fetais (7,11). O dano fetal ocorre através da destruição de células induzida pelo vírus, bem como o efeito do vírus na paragem da mitose (1,3).

Apesar da infeção fetal poder ocorrer durante toda a gestação, a frequência e a gravidade das complicações diminuem se a infeção materna acontecer após o primeiro trimestre, uma vez que se inicia o desenvolvimento de respostas imunes humorais e mediadas por células na mãe e ocorre transferência de anticorpos maternos para o feto (1,2).

A infeção no feto pode resultar em aborto espontâneo, morte fetal ou nascimento de criança com alterações congénitas (3,15). Um recém-nascido que apresente a tríada clássica de cataratas, anomalias cardíacas e surdez neurossensorial define-se com SRC. As complicações oftalmológicas e cardíacas ocorrem principalmente nas primeiras oito semanas de gestação e os danos cerebrais e auditivos nas primeiras 18 semanas (3). A surdez é a complicação mais comum e, por vezes, a única manifestação de infeção por rubéola. No entanto, também podem ser observadas outras malformações do tipo *major* (glaucoma congénito, microcefalia, retinopatia), do tipo *minor* (púrpura trombocitopenia, esplenomegalia, icterícia nas

primeiras 24 horas de vida) ou apresentar um quadro assintomático ao nascer, surgindo manifestações clínicas tardiamente tais como surdez parcial ou atraso psicomotor. Posteriormente pode igualmente surgir diabetes mellitus. Bebés que sobrevivam ao período neonatal têm maior risco de atraso no desenvolvimento, incluindo autismo. Quando a infecção fetal ocorre sem alterações congênitas denomina-se infecção por rubéola congênita (IRC) (2,7,11,13).

## **1.5 Tratamento**

Atualmente, não existe nenhuma terapêutica antiviral indicada para a rubéola. Como a maioria dos casos a rubéola são subclínicos e autolimitados, ou seja, evolui espontaneamente para a cura, não requer tratamento específico. O tratamento deve ser indicado apenas no alívio dos sintomas. No entanto, em situações de SRC, o tratamento passa por intervenções cirúrgicas para os defeitos congênitos cardíacos, oculares e algumas deficiências na audição. (2)

## **1.6 Epidemiologia**

A rubéola é uma doença com distribuição mundial e afeta principalmente crianças e adultos jovens. Ocorre de forma sazonal, em zonas temperadas durante o final do inverno e início da primavera, com epidemias a cada cinco a nove anos. Estes ciclos encontram-se relacionados com a acumulação de pessoas suscetíveis na população e taxas de contato. A extensão e a periodicidade da epidemia é variável nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (2,13,16).

Antes da implementação da vacina, as grandes epidemias levavam a elevados níveis de morbidade. Exemplo disso foi a epidemia nos EUA entre 1964 e 1965, que resultou em 11 000 óbitos (17). No Reino Unido, ocorriam epidemias a cada 4-7 anos e a maior parte da população tinha adquirido imunidade natural aos 15 anos de idade; porém cerca de 18% das mulheres em idade fértil permaneciam suscetíveis à infecção primária e, por isso, continuavam a surgir casos de SRC (15). A estimativa de casos de SRC que ocorriam durante períodos endêmico variava entre 0,1 a 0,2 por 1000 nados-vivos, enquanto durante as epidemias era de 0,5-4,0 por 1000 nados-vivos tanto em países em vias de desenvolvimento como em países desenvolvidos (13,18).

Os países desenvolvidos que implementaram nos planos de vacinação a vacina da rubéola (monovalente ou combinada) reduziram o número de casos de infecção e de SRC, conseguindo em muitos casos eliminar a doença. Desde 2004 que a rubéola foi eliminada nos EUA, enquanto os últimos casos endêmicos de rubéola na América ocorreram em 2009 sendo declarada a sua eliminação nesta região em 2015, demonstrando assim a eficácia da vacinação. Continuam, no entanto, a ocorrer importações internacionais de países onde a rubéola é endêmica. O número de casos de rubéola na Europa registou uma redução de 98% entre 2000 e 2009 (8,13,19–21). No entanto, e no mesmo período, o número de casos de rubéola diminuiu apenas 35% na região do Mediterrâneo. Pelo contrário, a região Africana e o Sudoeste Asiático aumentaram os casos de

rubéola 20 e 14 vezes, respetivamente. Este aumento ocorre porque estas são zonas em desenvolvimento e só alguns países têm a vacina nos seus planos de vacinação (21).

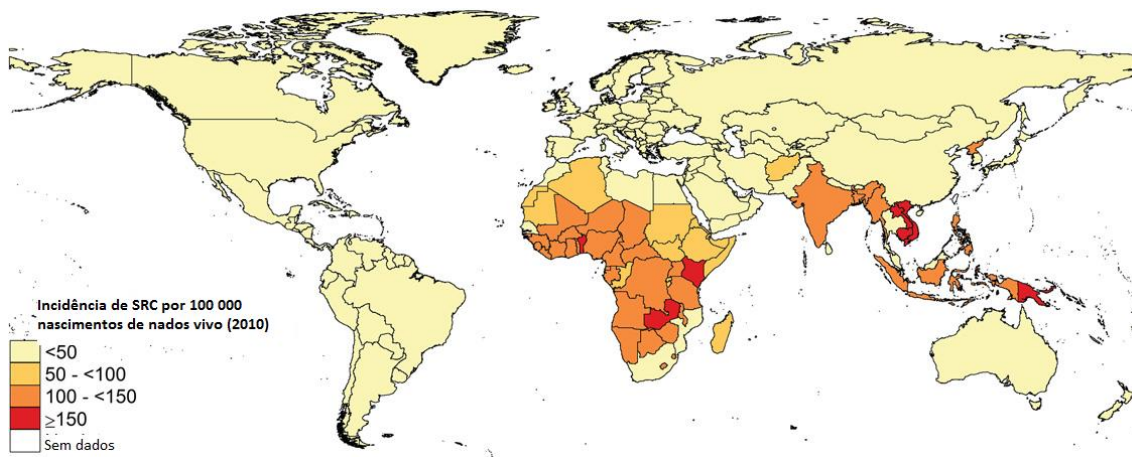
Em 2016 foram reportados 22 361 casos de rubéola à OMS, uma diminuição de 97% face ao ano de 2000 (670 894 casos). No entanto, acredita-se que o valor real seja bastante superior, pois esta é uma doença muitas vezes assintomática e sua ocorrência é subnotificada (22).

Apesar do progresso após a implementação da vacina, a rubéola ainda é considerada um problema mundial de saúde pública. Na Europa, esta é uma doença de declaração obrigatória e vários casos têm surgido de diversos países. Em 2012 ocorreu um surto de rubéola na Roménia, afetando maioritariamente indivíduos do sexo masculino devido a uma estratégia de vacinação que incidia em mulheres (20,23). Na Polónia, nos primeiros 4 meses de 2013, foram registados 21 283 casos de rubéola (o maior desde 2007). Tal como na Roménia, o surto ocorreu principalmente em homens (81%) entre os 15 e 29 anos. Isto permite observar os efeitos da vacinação seletiva em raparigas adolescentes desde 1989. Foi possível obter o estado imunológico em 15 237 casos notificados, 10% estavam vacinados com uma dose de vacina contendo rubéola e apenas 2% com duas ou mais doses (20). Também em 2013, mas no continente asiático (Japão), foi descrita uma epidemia com 13 casos de SRC e com mais de 11 000 casos de rubéola em que 70% ocorreram em homens entre 20 e 39 anos, assinalando mais uma vez o enfraquecimento na estratégia inicial que fornecia a vacina apenas a raparigas adolescentes (24). Os últimos dados disponibilizados são referentes ao período entre Julho de 2018 a Junho de 2019, em que foram notificados 483 casos de rubéola na Europa. O maior número de casos foi descrito pela Polónia (372 casos), Alemanha (57 casos), Itália (24 casos), Espanha (12 casos) e Roménia (4 casos) (25).

Para além destes surtos, segundo a OMS, um terço da população mundial ainda não dispõe da vacina, estando suscetível à infeção. Em 1996, no continente africano, nasceram cerca de 22 000 crianças com SRC. Estes números mantêm-se, uma vez que poucos países implementaram a vacinação contra a rubéola nos seus programas de imunização (26).

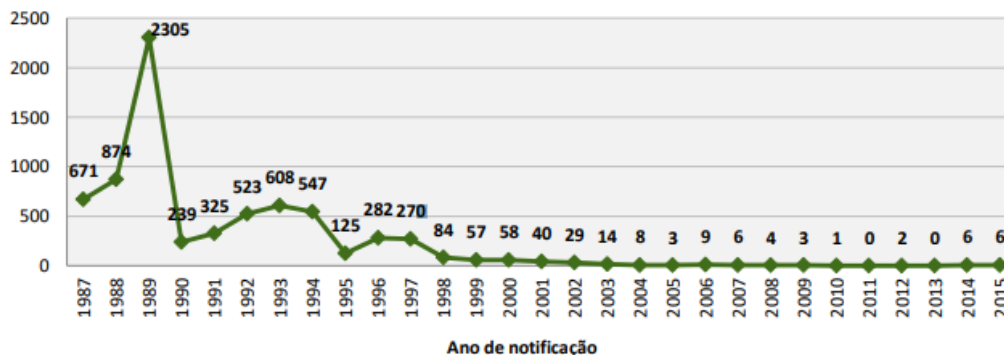
Os surtos de rubéola são normalmente seguidos por um aumento de SRC. O maior risco de SRC ocorre principalmente nos países com altas taxas de suscetibilidade entre mulheres férteis e que ainda não introduziram a vacina contra a rubéola. Até 2007, de acordo com a OMS, nasceram mais de 100 mil bebés com SRC por ano em países em desenvolvimento (2,3,16).

Em 2010 foi calculada por país a incidência da SRC por 100 000 nascimentos de nados vivos. Verificou-se que os países com maior incidência pertencem às regiões Africana e do Sudoeste Asiático (figura 3) (27).



**Figura 3.** Dados sobre a incidência da SRC em 2010. [adaptada] (27)

Em Portugal, a rubéola e a rubéola congénita são doenças de declaração obrigatória. Entre 1987 e 2015 tem havido uma diminuição de casos de rubéola (exclui casos de SRC) (figura 4). Os casos notificados entre 2012 e 2015 ocorreram maioritariamente em mulheres (nove casos) e apenas cinco casos em homens (28). Segundo o instituto nacional de estatística, em 2017 foram declarados quatro casos de rubéola, três deles pertencentes a indivíduos do sexo feminino e um do sexo masculino. Estes valores não têm em conta casos de SRC (29).



**Figura 4.** Número de casos notificados de rubéola, Portugal, 1987-2015 [adaptada] (29)

Também os casos de SRC têm vindo a diminuir sendo, nos últimos anos, praticamente inexistentes (figura 5) (28). Entre 2009 e 2015 foram notificados três casos de SRC, dois dos quais foram importados do continente africano e um foi autóctone, uma vez que a mãe não viajou para fora do país e não foi estabelecida uma ligação epidemiológica entre a infeção materna e o contato com um caso importado (11).

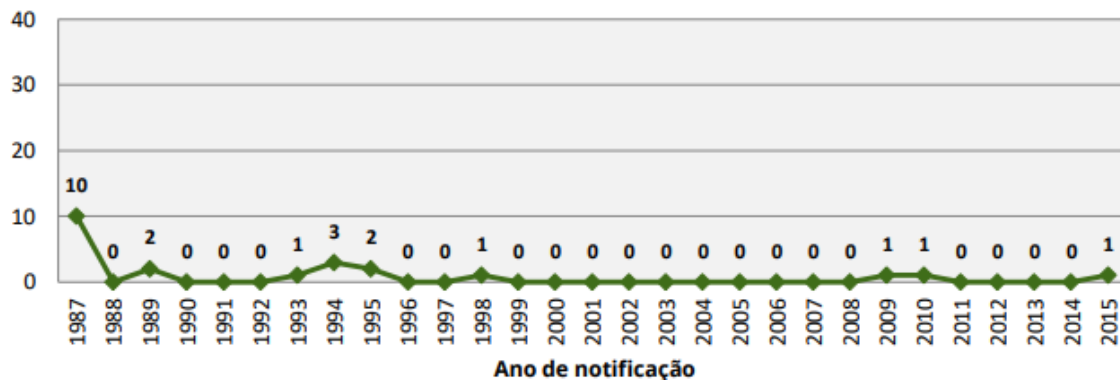


Figura 5. Número de casos notificados de Rubéola Congénita, por ano de notificação, Portugal, 1987-2015 [adaptada] (28)

Apesar destes casos, com base nas altas taxas de cobertura vacinal e na não existência de casos confirmados, Portugal teve pela primeira vez o estatuto de eliminação da rubéola em 2015 e tem-no mantido até ao momento (30,31).

## 1.7 Erradicação e Prevenção

Para prevenir a disseminação da rubéola e a infeção congénita é essencial que os países estabeleçam sistemas eficazes de vigilância e relatem os resultados à OMS (3). É de igual importância a implementação de campanhas de sensibilização, alertando a população sobre a forma de transmissão e salientar a importância da vacinação (23). Existe a possibilidade de erradicar globalmente a rubéola, porque como foi referido anteriormente o homem é o único hospedeiro conhecido, as vacinas são seguras e altamente eficazes ( $\geq 95\%$  imunes após uma única dose) e o diagnóstico é eficiente. No entanto, durante o processo de erradicação é fundamental o comprometimento político e quando atingida esta meta, devem-se manter planos de ação durante os anos seguintes, uma vez que os países estão sob risco constante de importar e reintroduzir o vírus (8,13,20). Os profissionais de saúde têm também um papel importante de sensibilização das comunidades para que se alcance altos níveis de imunização contra a rubéola (32).

Encontra-se descrito em alguns estudos que a rubéola é mais fácil de erradicar do que o sarampo. Em Portugal, foram descritos alguns surtos de sarampo mesmo na população com alta cobertura vacinal. Os casos ocorreram em profissionais de saúde que apesar de vacinados tiveram um elevado nível de exposição ao vírus (33). Também no Reino Unido a mesma situação foi descrita (13). No caso da rubéola isso não tem sido descrito.

Em muitos países, é recomendado o rastreio de anticorpos contra a rubéola na consulta pré-concepcional de forma a identificar e vacinar mulheres suscetíveis. No entanto, é importante perceber quais os casos classificados como suscetíveis e na realidade estão protegidos, porque isto leva a *stress* nas mulheres

grávidas e a alguns custos no acompanhamento pós-parto. É por isso essencial rever os valores de proteção (15,17,20).

Em 2012 foi criado o Plano Estratégico Global de Sarampo e Rubéola 2012-2020 com o objetivo de alcançar um mundo sem sarampo, rubéola ou SRC. Este plano visa eliminar o sarampo em seis regiões da OMS e a rubéola em duas regiões (8). Foram definidas cinco etapas: 1) alcançar e manter níveis elevados de imunidade na população, obtendo uma cobertura vacinal superior a 95% com duas doses de vacina; 2) Controlar a doença utilizando vigilância eficaz e avaliar os esforços programáticos; 3) Criar um plano de resposta rápida a surtos; 4) Comunicar de forma a construir confiança pública e demanda por imunização; 5) Realizar pesquisa e desenvolver apoios para operações de baixo custo e para ferramentas de vacinação e diagnóstico (13,34).

Três das seis regiões da OMS (África, Mediterrâneo Oriental e Sudoeste Asiático) ainda não estabeleceram metas de controlo ou eliminação da rubéola. A região do Pacífico Ocidental tinha determinado a prevenção de SRC (<1 caso de SRC por 100 000 nados-vivos) até 2015. Por sua vez, a Europa tinha como meta a eliminação até 2015, não tendo, no entanto, sido bem-sucedida, ao contrário da América que já atingiu a eliminação (13).

### **1.7.1 Vacinação**

O controlo e prevenção da rubéola baseiam-se principalmente na vacinação. Antes da introdução da vacina contra a rubéola, a infeção ocorria durante a infância e 85% a 95% das mulheres estavam imunes na idade fértil. No entanto, ocorriam epidemias periódicas em crianças que atingiam mulheres adultas suscetíveis e provocava elevados casos de SRC (18).

Em 1969 foi licenciada uma vacina viva atenuada e crianças entre um e quatro anos receberam uma dose única. No ano seguinte, foram vacinadas mulheres em idade fértil, estudantes universitários, militares e profissionais de saúde. Em 1978, a vacina combinada trivalente contra o sarampo, a parotidite epidémica e a rubéola (VASPR) foi introduzida e um ano depois a vacina contra a rubéola RA 27/3 substituiu a HPV-77 e Cendehill. Dez anos mais tarde, foram implementadas duas doses de VASPR, não parecendo no entanto que, após uma única dose haja um aumento de transmissão do vírus, indicando que a dose única pode ser adequada para interromper a transmissão (10,13).

Em comparação com as outras vacinas, a vacina baseada na estirpe atenuada viva RA27/3 induz títulos mais elevados de anticorpos e produz uma resposta imune muito próxima da infeção pelo vírus do tipo selvagem, sendo esta a vacina mais utilizada mundialmente (4,6,10).

O vírus da vacina RA 27/3 é isolado a partir da faringe e é atenuado por 25-30 passagens em cultura de tecidos, utilizando fibroblastos diploides humanos. Este vírus atenuado não é transmissível, exceto nos

casos de amamentação em que a criança pode desenvolver erupção leve. É uma vacina segura, mais imunogénica do que vacinas utilizadas anteriormente e produz seroconversão entre 95-100% (2,10).

As últimas estimativas da OMS relativas à cobertura vacinal de imunização mostram que 15 países da União Europeia (UE) relataram pelo menos 95% de cobertura vacinal para a 1ª dose da vacina contendo rubéola em 2017. Apenas Portugal, Hungria, Eslováquia e Suécia relataram cobertura vacinal de pelo menos 95% para as duas doses. No entanto alguns países como a França, Itália, Bulgária e Polónia têm baixas taxas de cobertura. (25)

Em Portugal, a vacina contra a rubéola foi introduzida no Plano Nacional de Vacinação (PNV) em 1984 e foram imunizadas adolescentes do sexo feminino com idades entre 11-13 anos e mulheres adultas não imunes. Em 1987 iniciou-se uma segunda fase preventiva com a administração universal de uma dose única aos 15 meses em ambos os sexos, da VASPR. Mais tarde, em 1990, foi adicionada mais uma dose entre os 11 e os 13 anos. Em 2000, a segunda dose foi antecipada para os 5-6 anos, e foram vacinadas adolescentes entre os 10 e 13 anos com data de nascimento anterior a 1993. Em 2012, a primeira dose passou para os 12 meses obtendo mais precocemente imunidade individual e de grupo e em 2017 a segunda dose foi definida aos 5 anos de idade sendo este o plano atualmente (figura 6) (11,31,35).

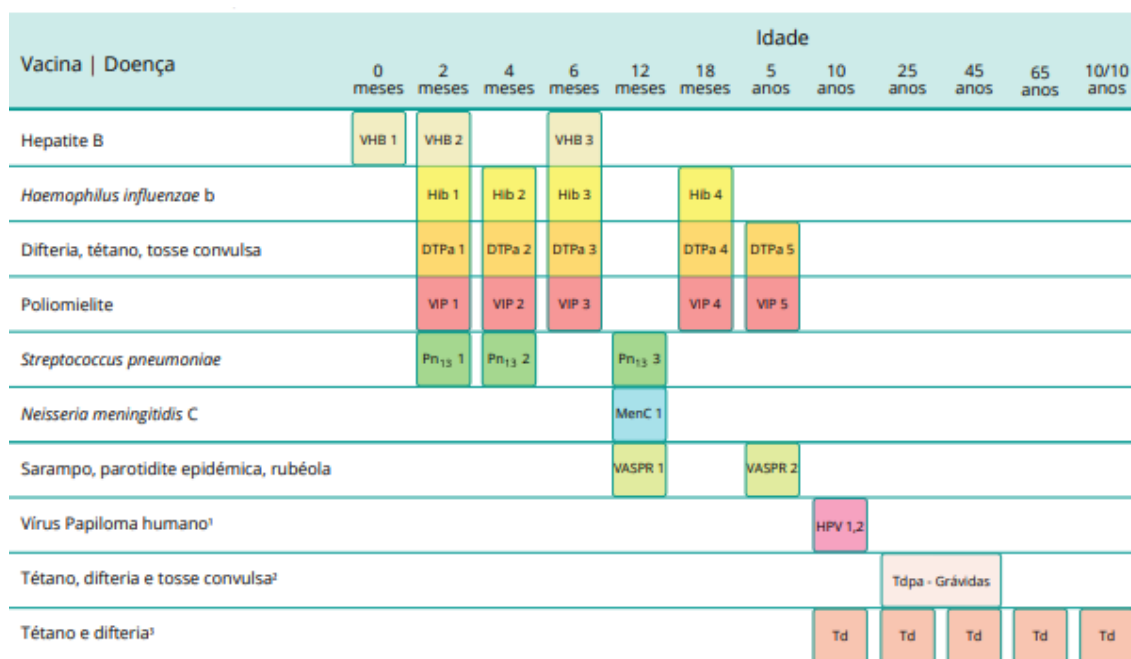
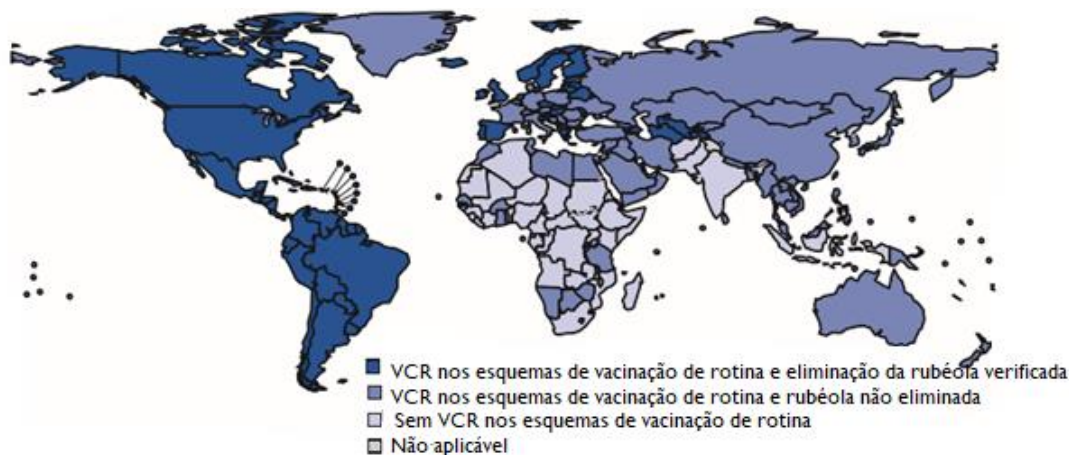


Figura 6. Programa Nacional de Vacinação atual, Portugal, 2019 [adaptada] (31)

Em 2016, a vacina contra a rubéola estava implementada nos planos nacionais de vacinação em cerca de 70% dos 193 estados membros da OMS, refletindo-se numa redução substancial da incidência global de casos de rubéola e SRC (figura 7). Sabe-se que em países como Roménia, Polónia, África do Sul, China, Vietnam e Indonésia ainda permanecem reservatórios de vírus da rubéola. Isto deve-se a uma cobertura

vacinal inadequada ou aos “Objetores de consciência” à vacinação por motivos religiosos, por exemplo. A fonte mais comum de infecção em países com boa cobertura vacinal é através de indivíduos infectados que viajam para e de regiões onde a rubéola é endêmica (6,10).



**Figura 7.** Mapa dos países que possuíam, em 2016, estratégias de vacinação contra a rubéola (VCR) [adaptada] (22)

Uma consequência dos programas de vacinação contra a rubéola é a diminuição da circulação do vírus selvagem e consequentemente a diminuição da percentagem de indivíduos naturalmente imunes. É também possível observar uma redução dos níveis de imunoglobulina G (IgG) nos indivíduos vacinados em comparação com os que adquiriram imunidade a partir do vírus selvagem. Este é um dos fatores que leva a problemas na padronização dos testes e na interpretação clínica do estado imunológico/não imune dos indivíduos (6,10,36). Há 20 anos atrás já se considerava que as concentrações de anticorpos adquiridos por vacina iriam diminuir ao longo do tempo para menos de 10UI/mL (1).

Na Finlândia, observou-se que, seis meses após a toma de duas doses de VASPR, todos os indivíduos tinham  $IgG \geq 10UI/mL$ , no entanto 20 anos depois 24% tinham valores inferiores a 10UI/mL (37). No Canadá, entre 2009 e 2012, realizou-se um estudo de *coorte* em grávidas e em 10,1% os níveis de IgG estavam entre 5 e 10UI/mL, apesar das participantes serem vacinadas (6,38,39). Na França não foi atingida uma alta cobertura com duas doses, mas as mulheres que receberam uma dose foram consideradas imunes à rubéola e não são rastreadas (6).

Foi demonstrado que, após uma única dose da vacina VASPR, só 9% de 307 crianças permanecem seronegativas e 60% tiveram o nível mais baixo detetável por um teste de neutralização (TN). Um mês após a segunda dose, apenas 1% permaneceu seronegativa. Doze anos após a segunda vacinação, a resposta imune diminuiu para os valores registados na primeira vacina (36).

Nos países em desenvolvimento tem sido difícil introduzir as vacinas nos seus programas devido a duas razões principais. A primeira, devido ao custo. Embora o preço da vacina seja relativamente baixo, ao ser

adicionada nos programas de vacinação em países com orçamento de saúde sobrecarregados, leva a um peso adicional difícil de sustentar. A outra razão é que para evitar o aumento de casos de SRC, para além de ser necessário manter uma cobertura vacinal acima de 80%, são também necessários programas de imunização contra a rubéola para alcançar imunidade de grupo e muitos países não seriam capazes de sustentar tais projetos (21).

No entanto, mesmo com a redução da seroprevalência em populações vacinadas, até ao momento não se verificou a ocorrência de grandes surtos de rubéola nem um aumento de incidência de SRC, sendo indício de que baixos níveis de IgG do vírus da rubéola podem ser suficientes para proteção (4,6).

## **1.8 Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico da rubéola baseado apenas em sinais e sintomas clínicos não é consistente, por um lado porque existem outras causas de erupção cutânea que podem mimetizar a infeção por rubéola (sarampo, escarlatina, eritema infeccioso) e por outro, a grande maioria das infeções podem ser subclínicas (3).

### **1.8.1 Determinação do estado de infeção**

O estado de infeção da rubéola pode ser determinado recorrendo a vários métodos laboratoriais. Atualmente, os métodos laboratoriais mais utilizados são a serologia, a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e a cultura viral (2,3,17):

- a) Deteção de anticorpos IgM para a rubéola por imunoensaio enzimático. Os testes podem variar no método, sensibilidade e especificidade e podem ocorrer resultados falsamente positivos em pessoas com outras infeções virais, como por parvovírus B19 ou mononucleose infecciosa, ou por fator reumatoide positivo. Além disso, a IgM é normalmente detetável entre 4 a 30 dias após o início da erupção cutânea, mas pode permanecer durante um ano após a infeção natural, vacinação ou reinfeção. (Este método não deve ser utilizado nas situações em que tenha sido administrada vacina oito dias a oito semanas antes da colheita da amostra);
- b) Seroconversão IgG ou aumento no mínimo de quatro vezes o título para o vírus da rubéola. A segunda amostra deve ser colhida 10 dias após a primeira (exceto nos casos em que foi administrada vacina oito dias a oito semanas antes da colheita da amostra);
- c) Deteção do genoma viral por PCR, sendo possível detetar o vírus entre um semana antes e duas semanas após o início da erupção cutânea;
- d) Cultura viral positiva para vírus da rubéola, sendo um método de extrema importância principalmente nos casos suspeitos de rubéola ou SRC. No entanto, esta excelente ferramenta epidemiológica não é efetuada rotineiramente porque é laboriosa e onerosa.

Dos métodos acima referidos, o mais utilizado para confirmação do diagnóstico de rubéola é a serologia. A colheita de soro deve ser feita entre 7 a 10 dias após o início da doença e novamente 14 a 21 dias depois. Os testes disponíveis variam entre laboratórios (2).

Para além do soro, pode ainda ser utilizado líquido cefalorraquidiano, urina e secreções nasofaríngeas. Em casos de SRC pode ser feita biópsia dos tecidos. É possível isolar o vírus a partir de secreções nasofaríngeas uma semana antes e até duas semanas após o início da erupção cutânea (3).

Os testes para diagnosticar rubéola devem ser realizados quando houver suspeita de infeção com base em sintomas clínicos ou caso haja exposição conhecida. No entanto, verifica-se que os testes de IgM são pedidos inadequadamente em consultas pré-concepcionais em mulheres assintomáticas (19).

### **1.8.2 Determinação do estado imunitário para a rubéola**

Para determinar o estado imunitário para a rubéola é efetuada a determinação da concentração da IgG específica. Quando o vírus foi descoberto, o método de referência utilizado foi o TN. Este é, no entanto, um teste laborioso para ser utilizado na rotina laboratorial, por isso só se encontra disponível em alguns laboratórios de referência. Consequentemente, este teste foi substituído pelo teste de inibição de hemaglutinação/hemaglutinina (HAI), maioritariamente usado até aos anos de 1980. Muitos dos testes atuais foram calibrados utilizando HAI. Atualmente, nos países desenvolvidos em que a imunidade ocorre principalmente devido à vacinação, a determinação de imunidade é efetuada a partir de imunoensaios comerciais, utilizando sistemas de deteção enzimática ou quimiluminescência (4,6,7,13,40,41).

Devido às graves consequências da rubéola na gravidez, encontra-se padronizado o teste pré-natal da IgG para rubéola de forma a identificar mulheres que não sejam imunes para que estas sejam vacinadas após o parto de forma a prevenir futuras infeções por rubéola (10,19).

É essencial que os resultados laboratoriais sejam bem interpretados clinicamente, para minimizar a ansiedade do paciente, especialmente se a interrupção da gravidez for considerada (17). No entanto, analisando o que tem sido descrito ultimamente, é possível observar que a padronização dos testes do vírus da rubéola não é eficaz. Tem sido possível observar resultados diferentes para uma mesma amostra utilizando *kits* comerciais diferentes e, consequentemente, diferentes interpretações quanto à imunização (4).

#### **1.8.2.1 Padrão internacional**

O padrão internacional é uma amostra liofilizada reconstituída com solução salina para o vírus da rubéola utilizado pelos fabricantes para padronizar resultados quantitativos reportados nos testes de IgG contra este vírus (10).

Em 1970, o Comitê de Peritos em Padronização Biológica da OMS disponibilizou um soro de imunoglobulina humana normal com um soro de referência internacional de vírus da rubéola com base nos resultados obtidos nos TN, denominado Segunda Preparação Internacional de Referência do Soro anti-rubéola (4,38,42). Todos os padrões subsequentes, incluindo o RUBI-1-94 introduzido em 1995, foram calibrados contra esta preparação de referência. Este padrão consiste numa *pool* de Ig humana normal e com aproximadamente 1600UI por ampola (43).

A partir de 1980 todos os resultados passaram a ser relatados em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) (10). Foram descritos valores mínimos, dependendo da técnica utilizada, abaixo dos quais os indivíduos devem ser vacinados (12UI/mL para hemólise radial única; 24-48UI/mL para HAI e 5-15UI/mL para imunoenaios comerciais). Contudo, estes valores não eram representativos do limite para a imunidade protetora. Em 1992, com base na resposta da IgG do vírus da rubéola e avidéz após vacinação, o *cut-off* foi estabelecido em 10UI/mL, mantendo-se inalterado desde então. Em 1996 houve uma tentativa de definir o último padrão internacional da OMS para a IgG do vírus da rubéola (RUBI-1-94), baseado em HAI, hemólise radial única e imunoenaios comerciais. No entanto, foram observadas várias reações falso-positivas e não era possível diferenciar entre títulos baixos de anticorpos e inibidores não específicos de aglutinação (4,7).

Várias publicações têm sublinhado a falta de comparação de resultados entre ensaios. Os testes utilizados para definir o valor ao padrão são agora obsoletos e foram substituídos por imunoenaios comerciais baseados em tecnologias superiores. Para além disso, este valor foi definido numa época em que existia uma maior circulação do vírus da rubéola do tipo selvagem e a maioria dos indivíduos testados quanto aos níveis de anticorpos adquiriu imunidade por infeção natural. Atualmente o vírus selvagem circula cada vez menos nas populações vacinadas e as oportunidades para os impulsionadores naturais pós-vacina tornaram-se raros (4,7,38). Várias equipas têm demonstrado nos seus estudos que a imunidade induzida por vacina provoca menores níveis de anticorpos em comparação com a induzida por infeção natural (44-49).

Com base no que tem sido descrito, é visível que a padronização não tem sido eficaz, uma vez que quando se utilizam diferentes imunoenaios na mesma amostra, os resultados são diferentes, levando a interpretações erradas. Dimech *et al.*, propôs algumas razões pelas quais existe falta de padronização dos testes de IgG contra o vírus da rubéola e continuam a persistir por mais de 40 anos após a criação do padrão (10).

### **1.8.2.2 Teste de Neutralização**

O TN foi o primeiro teste utilizado para realizar diagnóstico serológico e determinar o estado imunitário. A deteção de anticorpos neutralizantes específicos do vírus é o marcador ideal para a determinação da

imunidade contra um microrganismo viral uma vez que permite avaliar a função biológica de anticorpos, deteta outras classes de anticorpos que o *immunoblot* (IB) não deteta como IgA e IgM e deteta anticorpos tanto para E1 como para E2 e a reatividade neste teste ainda é o indicador mais confiável de imunidade protetora (7,10,38,40,41).

Apesar de haver possibilidade de automatização da técnica em certas fases do processo, este continua a ser um teste trabalhoso, demorado, com diferentes sensibilidade e com o qual se obtinham títulos baixos (10,13,38).

### **1.8.2.3 Teste de inibição da hemaglutinação**

Este teste veio substituir o TN e baseia-se no princípio de que a hemaglutinina do vírus aglutina os eritrócitos de várias espécies animais. Deteta tanto IgG como IgM, mas podem ocorrer falsos-negativos se estiverem presentes anticorpos específicos para o vírus da rubéola diferentes daqueles contra a hemaglutinina, por exemplo, anticorpos anti-proteína C. Para além disso, os resultados podem ser variáveis devido à seleção de reagentes (utilização de espécies diferentes e à qualidade dos eritrócitos), à escolha do antigénio viral e à metodologia aplicada (temperatura, tempo de incubação, pH dos reagentes) (50).

### **1.8.2.4 Imunoensaios comerciais**

Os imunoensaios comerciais vieram substituir os HAI pois estes podem detetar subclasses de anticorpos ou detetar antigénios específicos. Os imunoensaios IgG do vírus da rubéola inicialmente usavam uma placa de titulação com um sistema enzimático de deteção baseado na cor. O primeiro analisador automático para detetar IgG do vírus da rubéola foi o Abbott IMx, mas depois deste foram desenvolvidos outros analisadores utilizando diferentes sistemas de deteção como a imunofluorescência (bioMérieux VIDAS, Abbott AxSYM), a eletroquimioluminescência (Roche Elecsys) e a quimiluminescência (Abbott Architect, DiaSorin Liaison, Siemens ADVIA Centaur). Para além das diferenças nas tecnologias também os conjugados, substratos, antigénios, tempos e temperatura de incubação podem ser distintos. Apesar destes fatores poderem variar, estes testes demonstraram possuir boa linearidade e até sensibilidades e especificidades equivalentes em alguns estudos (10,17).

Os imunoensaios comerciais disponíveis atualmente encontram-se calibrados com o Padrão Internacional da OMS, dando os resultados em UI/mL. Os valores para a imunidade estão definidos acima de 10UI/mL (4,7,10).

Em consequência do que foi referido acima era expectável que os testes serológicos estivessem padronizados e que ao testar uma amostra com diferentes *kits* fosse possível assumir que os resultados e respetiva interpretação (positivo, negativo ou equívoco) seriam comparáveis. Porém, os antigénios utilizados (vírus total ou antigénio recombinante), o conjugado, o substrato, o sistema de deteção e o tipo

de teste (indireto, *sandwich*, competitivo ou captura) diferem entre testes e deste modo, dependendo do imunoensaio comercial utilizado, os resultados quantitativos de IgG e respetiva interpretação podem diferir e até serem discordantes para o mesmo soro. Este fenómeno é particularmente relevante para títulos baixos de IgG do vírus da rubéola (6,7,10,42).

O impacto resultante destas diferenças pode levar a uma gestão clínica confusa para mulheres grávidas consideradas imunes ou suscetíveis, dependendo do teste utilizado. Podem também levar a revacinações desnecessárias de indivíduos já imunes e ao relato de falsas seroconversões entre pessoas com baixos títulos de IgG do vírus da rubéola (4,7).

#### **1.8.2.5 Immunoblot**

O IB é considerado um teste mais específico do que sensível, permitindo detetar anticorpos específicos para o vírus da rubéola, designadamente anticorpos anti-invólucro (anti-E1 e anti-E2), anti-capsídeo (c) e o complexo antigénico anti-E1/E2 (7).

Os antigénios do vírus da rubéola são separados por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. É esta membrana que é utilizada para ser incubada durante a noite com as amostras diluídas em tampão (1/100). Quando presentes, os anticorpos específicos do vírus da rubéola ligam-se aos antigénios impregnados na membrana, enquanto os anticorpos não ligados são eliminados por lavagem. Numa segunda etapa é adicionado o conjugado e, mais uma vez, os anticorpos não ligados são eliminados pela lavagem. No final, ocorre uma reação que será visível após adição do substrato específico, visualizando-se bandas na tira de nitrocelulose (7).

Um IB é considerado positivo quando pelo menos a banda anti-E1 é observada e classifica-se como negativo se não forem observadas bandas (7). Segundo um estudo efetuado em 1999 por Nedeljkovic *et al.*, a resposta IgG contra a glicoproteína E1 é predominante em todos os grupos de pacientes, tanto nos imunizados com o vírus selvagem (pacientes com rubéola congénita ou infetados pelo vírus no período pós-natal) como a partir da vacina. No caso de reações dos anticorpos com as proteínas E2 e C foram descritas diferenças entre os grupos de pacientes. No grupo de pacientes com infeção pelo vírus da rubéola no período pós-natal foi demonstrada uma fraca reatividade anti-E2 no ensaio de imunotransferência com proteínas recombinantes autênticas (12). Best, *et al.*, considera que ao serem detetados anticorpos IgG para a glicoproteína E2 por IB indica que a infeção primária ocorreu mais de cinco meses antes (17). Zhang *et al.*, observaram que os anticorpos anti-E2 da classe IgG não eram detetados até um mês após o início da rubéola aguda, mas eram detetáveis na fase de convalescença (51). Pustowoit *et al.* utilizou testes de IB no seu estudo e observou que anticorpos-E2 apareceram nos primeiros três meses após a exposição (52). A maioria dos epítomos que neutralizam o vírus da rubéola localizam-se na glicoproteína E1 e os anticorpos dirigidos contra a proteína C e E2 isoladamente não são suficientes para proteger contra a infeção (53).

Encontra-se descrito que a proteína E2 é um antígeno fraco durante a infecção pós-natal e que os anticorpos anti-E1 se encontram de forma predominante na infecção adquirida no período pós-natal, enquanto os anticorpos anti-E2 eram relativamente abundantes em pacientes com SRC (12).

## **2 Objetivos**

O principal objetivo deste estudo é a avaliação do estado imunitário para o vírus da rubéola, utilizando o IB, numa população feminina que previamente tinha apresentado resultados equívocos ou negativos em dois imunoensaios comerciais.

Pretende-se ainda correlacionar os resultados obtidos no IB e as respostas sobre o estado vacinal.

Por ultimo, calcular os custos associados à utilização de cada um dos testes utilizados na determinação do estado imunitário para o vírus da rubéola.

### **3 Material e métodos**

#### **3.1 População em estudo**

Crítérios de inclusão: para este estudo foram incluídos indivíduos do sexo feminino que recorreram ao Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (CMLGS) para determinar o estado imunitário para a rubéola e cujos resultados apresentaram uma IgG negativa ou equívoca.

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética da Nova Medical School | Faculdade de Ciências Médicas (NMS-FCM) da Universidade Nova de Lisboa (Nº16/2019/CEFCM) (Anexo nº A).

#### **3.2 Amostras clínicas**

Foram utilizadas 150 amostras de soro colhidas entre Abril e Maio de 2019 nos postos de colheitas do CMLGS. Nas 150 amostras recebidas, foram incluídas quatro com resultado positivo, englobadas como grupo controlo e 146 com resultado de IgG específica para a rubéola, negativo ou duvidoso.

O sangue foi colhido para tubos com ativador da coagulação e gel separador (BD Vacutainer® SST™ II Advance) e após retração do coágulo foi centrifugado a 3000 rotações por minuto durante 10 minutos para obtenção do soro. As amostras de soro estiveram armazenadas a 4°C até serem analisadas.

As amostras após análise no CMLGS foram codificadas e armazenadas a 4°C até serem transportadas para o laboratório da Unidade Curricular de “Infeção: Etiologia, patogénese e bases terapêuticas” da Faculdade de Ciências Médicas | NOVA Medical School (FCM|NMS), onde se efetuaram alíquotas, que foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas.

#### **3.3 Metodologia utilizada na determinação de anticorpos IgG**

Todas as amostras foram testadas no CMLGS com o imunoensaio comercial Liaison® Rubella IgG (DiaSorin) e quando ocorreu um resultado negativo ou equívoco realizou-se um segundo imunoensaio comercial, VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux). Na FCM|NMS as amostras foram testadas com uma técnica de *Immunoblot* utilizando o *recomBlot* Rubella IgG (Mikrogen GmbH) para confirmação qualitativa dos resultados anteriores.

##### **3.3.1 *recomBlot* Rubella IgG**

O *kit recomBlot* Rubella IgG (Mikrogen) é constituído por dois recipientes de incubação com 10 cavidades de incubação, 20 tiras de teste numeradas sequencialmente e revestidas com antigénios da rubéola, uma tira de controlo pré-eluída e os seguintes reagentes (figura 8):

### 3.3.1.1 Reagentes

- Tampão de lavagem (tampão C) fornecido 5x concentrado, pelo que antes da sua utilização foi necessário realizar uma diluição 1/5 com água destilada.
- Conjugado anti-IgG humano fornecido 100X concentrado. A solução foi diluída com tampão C imediatamente antes da respetiva utilização.
- Substrato de benzidina de tetrametil cromogénica, soro de controlo com valor fracamente positivo E2, soro de controlo negativo (reagentes prontos a utilizar). Como a solução de substrato é fotossensível foi protegida da exposição solar.

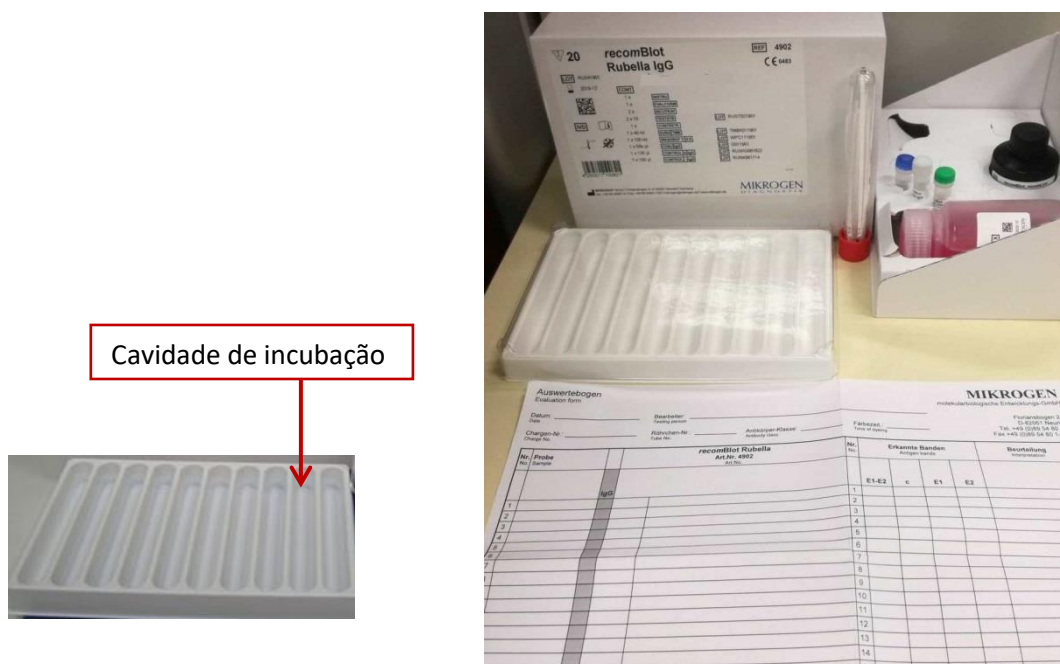


Figura 8. Componentes do kit recomBlot IgG,(Mikrogen)

### 3.3.1.2 Procedimento

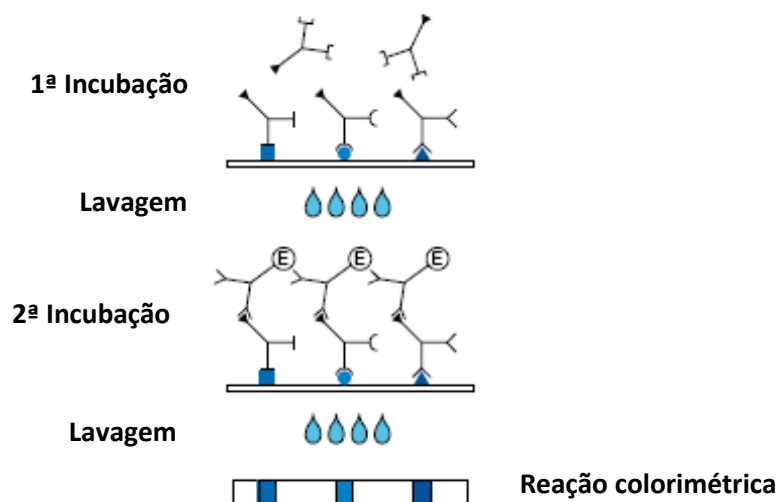
1. Colocou-se os reagentes à temperatura ambiente (18°C a 25°C) durante pelo menos 30 minutos antes do início do teste.
2. Descongelou-se e homogeneizou-se as amostras.
3. Efetuou-se o plano de trabalho introduzindo em cada série um controlo fracamente positivo E2 e um controlo negativo.
4. Pipetou-se 2mL de tampão C em cada cavidade incubação.
5. Com o auxílio de uma pinça, introduziram-se as tiras de teste nas cavidades de incubação.
6. Adicionou-se 20µL de cada amostra não diluída nas respetivas cavidades de incubação.
7. Incubou-se durante aproximadamente 12 horas (o protocolo permitia a incubação entre 10 a 16horas) sob ligeira agitação.

8. Aspirou-se cuidadosamente com auxílio da pipeta de Pasteur o líquido. Secou-se com papel absorvente.
9. Procedeu-se à lavagem com 2mL de tampão C durante 5 minutos, agitando ligeiramente. Aspirou-se todo o líquido com auxílio da pipeta de Pasteur.
10. Repetiu-se o passo anterior mais 3 vezes.
11. Adicionou-se 2mL de solução de conjugado, incubou 1h sob agitação ligeira.
12. Adicionou-se 2mL de tampão C, lavou-se durante 5 minutos agitando ligeiramente. Aspirou-se todo o líquido com auxílio da pipeta de Pasteur.
13. Repetiu-se o passo anterior mais 3 vezes.
14. Adicionou-se 1,5mL da solução de substrato. Incubou-se 10 a 15 minutos agitando ligeiramente e ao abrigo da luz solar. Mantiveram-se as tiras de teste na solução de substrato o tempo necessário, até que nas tiras do controlo foi reconhecível a banda E2.

Nota: No caso de soros com valor altamente positivo pode ocorrer uma hiper-reação de coloração. Nestes casos é recomendável terminar antecipadamente a reação.

15. Lavou-se com água desionizada, pelo menos 3 vezes (com auxílio de pipeta de Pasteur).
16. Secou-se as tiras de teste durante 2h entre papel absorvente, protegidas da luz solar antes de proceder à leitura dos resultados.

O procedimento do teste *immunoblot* encontra-se resumido na figura 9.



**Figura 9.** Esquema do procedimento do teste recomBlot Rubella IgG [adaptada] (54)

### 3.3.1.3 Validação dos resultados

A série foi considerada válida quando:

- O controlo negativo não apresentou reação nas bandas específicas. Apenas foi visível a banda de controlo de reação situada abaixo do número de série, isto é, no início da tira de teste.
- O controlo positivo, incubado com soro com valor fracamente positivo para a glicoproteína E2, apresentou bandas no controlo de reação, banda E1 e banda E2 (o dímero E1-E2 e a banda c podem ou não reagir) (figura 10).
- Todas as tiras das amostras em análise apresentaram a banda do controlo de reação colorida (banda escura).

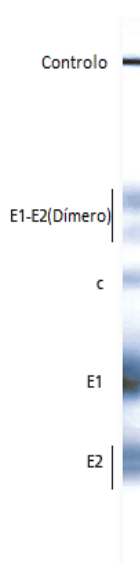


Figura 10. Tira de controlo pré-eluída

### 3.3.1.4 Interpretação dos resultados

A avaliação das tiras de teste foi efetuada através de observação visual comparando com o controlo positivo da série.

A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os pressupostos considerados válidos pela equipa coordenada por Christelle Vauloup-Fellous para este tipo de teste. Assim, os resultados foram considerados positivos quando, pelo menos, a banda anti-E1 foi visível, negativos quando nenhuma das bandas foi observada (exceto o controlo de reação), e equívocos quando as bandas não estavam claramente discriminadas (6,7).

## 3.4 Análise estatística

Os dados foram categorizados e organizados em tabelas e gráficos de frequência absoluta.

Utilizou-se o teste exato de Fisher para estudar a associação entre os resultados das duas variáveis independentes (resultados do IB e estado vacinal da população). Foi considerado um nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 População em estudo

O nosso estudo incluiu 146 indivíduos do sexo feminino que recorreram ao CMLGS para determinar o estado imunitário para o vírus da rubéola entre Abril e Maio de 2019. A idade média foi de 29 anos, com variação entre os 16 e os 57 anos (figura 11).

Habitualmente, nos países desenvolvidos, o rastreio para anticorpos contra a rubéola é realizado em mulheres em idade fértil, principalmente numa fase pré-concepcional ou durante a gestação, de forma a identificar e se possível vacinar, mulheres suscetíveis antes da gravidez ou logo após o parto. Outras razões descritas para fazer esta análise são a determinação do estado imunitário antes de terapia imunossupressora ou a suspeita de infeção aguda pelo vírus da rubéola (43).

Na nossa população foi incluída uma amostra de uma mulher com 57 anos, ou seja, fora da idade limite de fertilidade (15-49 anos). No entanto, neste estudo não tivemos acesso à informação clínica relativamente ao motivo pelo qual o rastreio estava a ser efetuado.

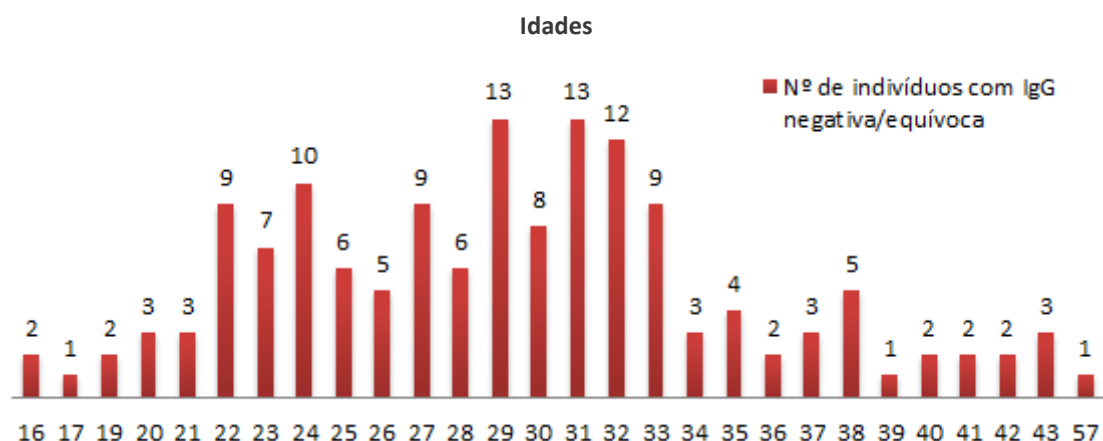
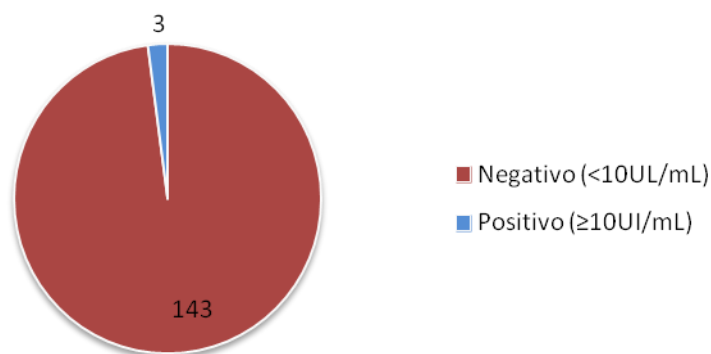


Figura 11. Distribuição da população em estudo por idades.

### 4.2 Determinação do estado imunitário para o vírus da rubéola

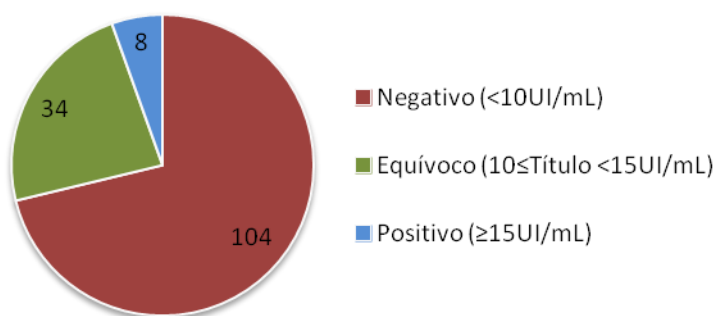
#### 4.2.1 Imunoensaios comerciais (avaliação realizada pelo CMLGS)

Inicialmente foi realizado o teste Liaison® Rubella IgG (DiaSorin) nas 146 amostras. Destas, 143 (98%) foram consideradas negativas (<10UI/mL), apresentando as restantes 3 amostras (2%) resultado positivo ( $\geq 10$ UI/mL) (figura 12), com um título que foi relativamente baixo, variando entre 10,30UI/mL e 12,2UI/mL, havendo por este motivo, a necessidade de realizar o teste confirmatório (anexo B).



**Figura 12.** Resultados do imunoensaio comercial Lisaison® Rubella IgG (DiaSorin), realizado no CMLGS.

O teste confirmatório utilizado no CMLGS foi o VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux). Das 146 amostras, 104 (71%) foram consideradas negativas (<10UI/mL), 34 (23%) apresentavam resultado equívoco ( $10 \leq \text{título} < 15 \text{UI/mL}$ ) e as restantes oito amostras (6%) foram consideradas positivas ( $> 15 \text{UI/mL}$ ) (figura 13) (anexo B).



**Figura 13.** Resultados do imunoensaio comercial VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), realizado no CMLGS.

#### 4.2.2 Immunoblot

No nosso estudo foi efetuada a avaliação das 146 amostras anteriormente referidas utilizando o *immunoblot* (IB) *recomBlot* Rubella IgG (Mikrogen GmbH) (considerado um ensaio de referência para avaliações qualitativas do estado imunitário para a rubéola) (6,7,10,43).

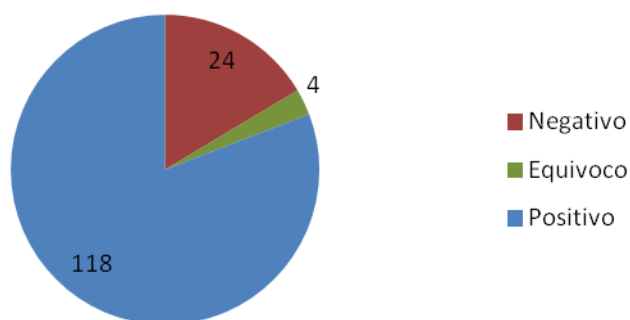
Este teste permite a determinação de anticorpos para antígenos específicos e importantes associados às várias etapas da resposta imunitária do indivíduo à infeção pelo vírus da rubéola (54).

Todos os testes IB realizados no decurso deste trabalho apresentaram os critérios de validação enumerados no ponto 2.3.1.3 –“Validação de Resultados”, tendo sido avaliados individualmente por comparação com o

controlo fracamente positivo E2 e por comparação das leituras individuais entre si, por dois observadores independentes.

O teste de IB permite a apresentação das proteínas estruturais E1, E2 e c da rubéola, por separação eletroforética de antígenos em condições não desnaturantes, tem alta sensibilidade e especificidade, é de fácil execução e possível de automatizar, permite uma avaliação segura devido aos soros de controlo e às tiras de controlo pré-eluídas e é altamente padronizado ao contrário de outros testes utilizados para determinar a IgG do vírus da rubéola, como o TN (54).

Os resultados das 146 amostras testadas mostraram que, 118 (81%) foram positivas, 24 (16%) foram negativas e quatro amostras (3%) foram equívocas porque houve dificuldade de leitura das bandas (figura 14) (anexo B). Ou seja, com este teste, 118 mulheres foram consideradas imunes ao vírus da rubéola.



**Figura 14.** Resultados obtidos com o teste IB *recomBlot* Rubella IgG (MIKROGEN)

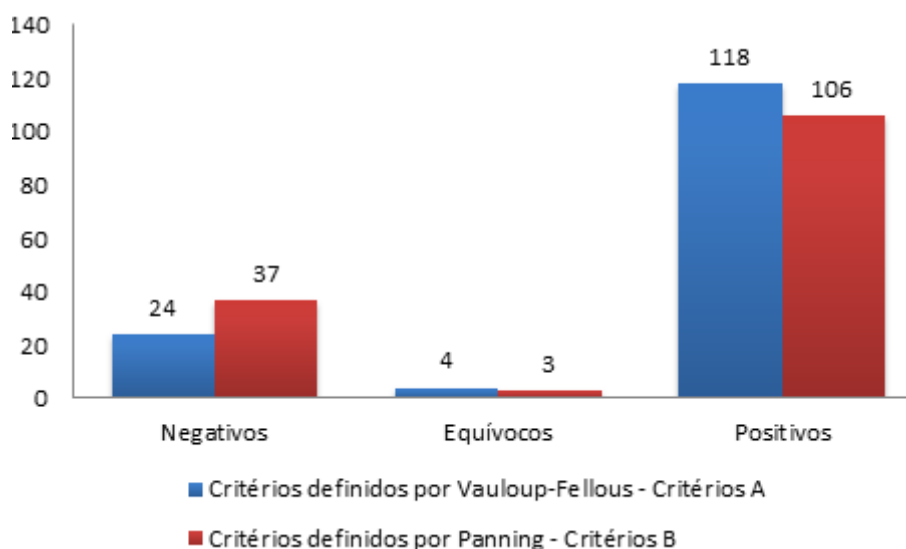
Está descrito que algumas tiras de teste podem apresentar uma coloração escura em toda a tira de nitrocelulose ou com um padrão diferente do apresentado na tira controlo. Estas situações ocorrem em soros de pacientes com alergias à lactoproteína, nestes casos deve ter-se especial atenção na interpretação dos resultados (54). No nosso estudo as 4 amostras equívocas apresentavam um padrão dificultando a leitura. É recomendado realizar um novo teste dessa mesma amostra e se o resultado equívoco persistir deve efetuar-se colheita de nova amostra para ser confirmada. No entanto, no nosso estudo não foi possível efetuar as repetições recomendadas.

Contudo a interpretação do IB não é consensual. Para interpretação dos resultados, a evidência científica não se encontra de acordo com o descrito na bula do teste. Segundo a equipa de Vauloup-Fellous, um IB é considerado positivo quando pelo menos a banda anti-E1 é observada e negativo se não forem observadas bandas (6,7). Estes critérios, aqui definidos como critérios A, foram aplicados no nosso estudo para definir os resultados. Esta escolha baseou-se na experiência desta equipa, relatada em pelo menos 2 artigos onde analisaram 508 amostras e em vários anos dedicados ao tema da rubéola. A equipa de Panning baseia o seu

critério de positividade na presença da banda E1, concordando com a equipa anterior, mas condiciona o resultado final à intensidade desta banda que tem que ser igual ou superior à intensidade da banda E2 do controlo fracamente positivo realizado na mesma série (aqui definido como critérios B). O artigo publicado por esta equipa analisou 150 amostras (43).

Estas são as duas equipas que trabalharam com IB e neste sentido os nossos resultados serão também discutidos em função dos critérios B.

Comparando os nossos resultados (leitura com base nos critérios A) com os que se obteriam utilizando os critérios B, verificamos que as 24 amostras por nós consideradas negativas também o seriam com os critérios B. No entanto, outras 12 amostras positivas passariam a negativas, com os critérios B, e uma das quatro amostras com resultado equívoco passaria a negativa (figura 15). Assim, os dois critérios são discordantes: com o critério A 118 mulheres estão imunes ao vírus da rubéola *versus* 106 com o critério B.



**Figura 15.** Comparação dos resultados obtidos nas 146 amostras analisadas por IB utilizando os critérios descritos pela equipa de Vauloup-Fellous (critérios A) e pela equipa de Panning (critérios B).

A equipa de Panning descreve ainda que em todas as amostras positivas para IB, pelo menos duas bandas (E1 e o dímero E1-E2) foram reativas (43). No nosso estudo esta situação foi observada em 75 amostras positivas.

### 4.3 Comparação dos resultados entre imunoensaios comerciais e *immunoblot*

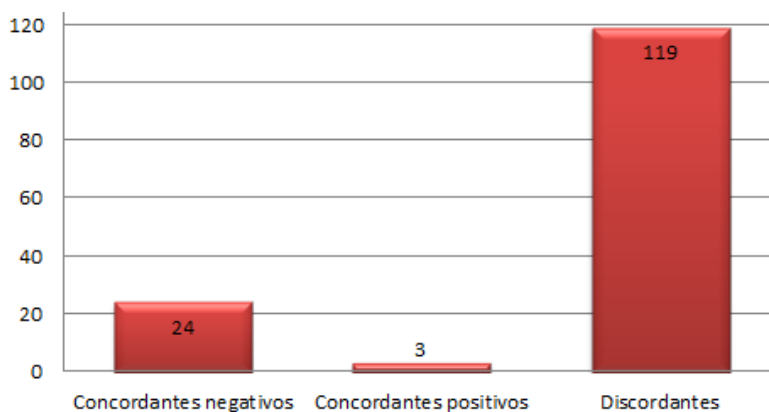
Um dos principais objetivos deste estudo consistia na comparação dos resultados do IB com os imunoensaios comerciais.

Estão disponíveis inúmeros imunoensaios comerciais que detetam e quantificam IgG anti-rubéola, os utilizados no CMLGS pertencem ao grupo dos mais utilizados a nível europeu, no entanto, existem outros,

tais como: Architect (Abbot Diagnostics), Cobas 6000 (Roche Diagnostics), Dxl (Beckman, Coulter) e Enzygnost (Siemens Healthcare). Em Portugal, em laboratórios públicos como privados, o VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), o Architect (Abbot Diagnostics) e o Cobas 6000 (Roche Diagnostics) são os mais utilizados, sendo que, a confirmação dos resultados negativos ou equívocos com um segundo teste não é efetuada na maioria dos laboratórios.

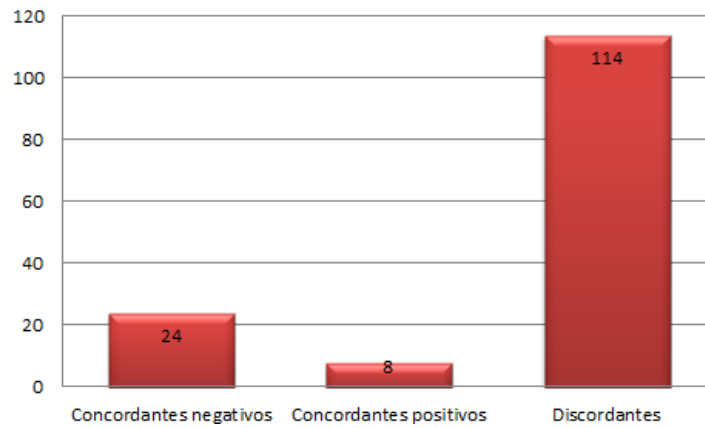
Todos eles são calibrados com o padrão internacional da OMS e os resultados são dados em UI/mL, o que sugere que, como os testes estão padronizados os resultados obtidos podem ser comparados. No entanto, os vários estudos que analisaram os resultados quantitativos obtidos em diferentes imunoenaios comerciais, chegam à conclusão que os títulos são muito discrepantes, não sendo possível a definição do estado imunitário unicamente com base neste valor (7,42,43,55).

Ao comparar os resultados obtidos no CMLGS com o Liaison® Rubella IgG (DiaSorin) e os do IB é possível observar que 27 amostras tiveram um resultado concordante nos dois ensaios (24 amostras foram negativas e três foram positivas) e as restantes 119 foram discordantes. Destas 119, todas tinham sido negativas para o imunoenensaio comercial, 115 foram positivas para o IB e as restantes quatro foram equívocas (figura 16).



**Figura 16.** Comparação dos resultados obtidos com IB e LIAISON® Rubella IgG (Diasorin)

Comparando com o teste VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), 32 amostras tiveram um resultado concordante nos dois ensaios (24 foram negativas e 8 foram positivas), sendo as restantes 114 discordantes. Nestas 114 amostras, 34 amostras positivas para o IB tinham sido equívocas para o imunoenensaio comercial, estando este resultado de acordo com o descrito pela equipa de Vauloup-Fellous (6). As 4 amostras equívocas para o IB tinham sido negativas no imunoenensaio comercial e as restantes 76 foram positivas para o IB mas negativas para o teste VIDAS RUB IgG II (bioMérieux) (figura 17).



**Figura 17.** Comparação dos resultados obtidos com IB e VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux)

A equipa de Vauloup-Fellous considera que a zona equívoca dos imunoensaios comerciais deve ser removida e esses resultados devem ser considerados positivos. Com esta alteração verifica-se uma maior concordância entre os resultados obtidos com os imunoensaios comerciais e o IB (7). Da mesma opinião é a equipa de Panning, que no seu estudo verificou que a concordância dos resultados melhorava substancialmente quando os resultados equívocos, dos imunoensaios comerciais, eram interpretados como seropositivos (43). Também no inquérito serológico nacional 2015-2016, os soros que obtiveram concentrações entre 10 e 14UI/mL (zona cinzenta), foram novamente testados e avaliados de acordo com o critério da OMS que considera 10UI/mL como nível de anticorpos protetor contra a infeção pelo vírus da rubéola (31).

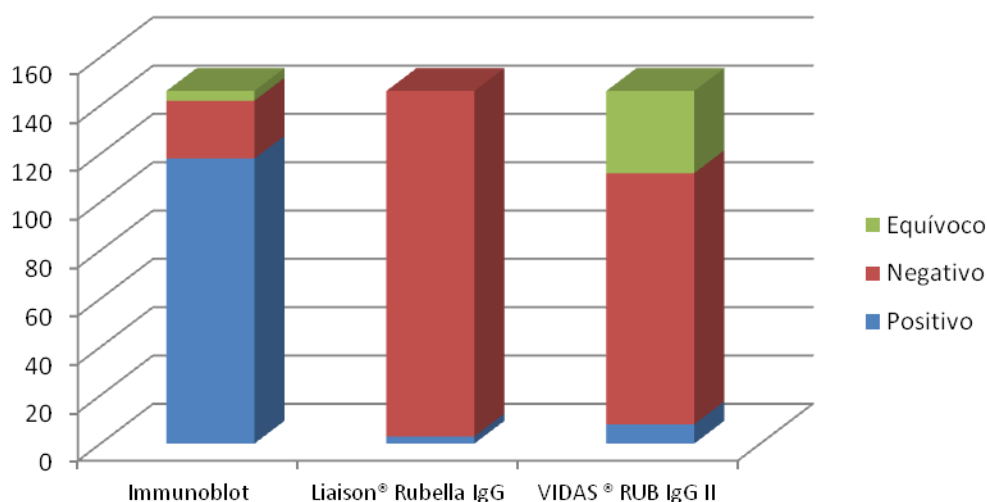
No presente estudo foi possível confirmar esta situação. Se os resultados equívocos do imunoensaio comercial VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux) tivessem sido considerados positivos, a percentagem destes aumentava de 5% para 29%, pelo que a concordância com os resultados obtidos no nosso estudo, isto é, com o IB, aumentava de 7% para 36%. Contrariamente, se os equívocos tivessem sido considerados negativos, a percentagem passaria de 71% para 95%, e a concordância com o IB diminuía consideravelmente.

Perante estas constatações poder-se-á considerar que o principal problema estará na definição do limite que estabelece o estado imunitário para a rubéola, tal como apontado pela equipa de Panning (43). O nosso estudo corrobora esta situação porque todas as amostras com resultado equívoco no VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux) apresentaram resultados positivos no IB, pelo que são verdadeiros positivos.

Nesta discussão é importante realçar que o risco para a saúde pública é mais elevado se forem fornecidos resultados falsos-positivos, uma vez que a população não estará protegida nem irá ser vacinada. Ao invés, resultados falsos-negativos implicam um risco menor mas conduzem a vacinações desnecessárias.

A passagem dos resultados equívocos, obtidos com os imunoenaios comerciais, para positivos, como defendido pelos autores acima referidos, não conferiria um risco porque o IB confirmou a existência de imunidade.

Ao comparar os resultados obtidos no CMLGS com os dois imunoenaios comerciais com os obtidos no nosso trabalho, com o IB, verificamos que este último apresenta uma maior percentagem de resultados positivos (figura 18).



**Figura 18.** Comparação dos resultados obtidos no IB e nos imunoenaios comerciais.

Dos 118 resultados positivos pelo IB, nenhum resultado foi positivo em simultâneo nos dois imunoenaios comerciais. Dos 24 resultados negativos pelo IB, todos foram negativos para os outros dois testes, tendo-se verificado que com o Liaison® Rubella IgG (DiaSorin) os valores variaram entre <0,20 e 1,32 UI/mL, mas com o VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux) o título foi sempre de 0 UI/mL. Se considerarmos 1,32 UI/mL o *cut-off* abaixo do qual o IB seria negativo (considerando o Liaison® Rubella IgG (DiaSorin)), verificamos que duas amostras (76 e 135) tiveram valores inferiores a 1,32UI/mL e foram positivas com o IB (Tabela 1), pelo que estes seriam resultados falsamente negativos se opção fosse este *cut-off*.

**Tabela 1.** Comparação dos resultados das amostras número 76 e 135 utilizando três testes convencionais para determinação do estado imunitário para o vírus da rubéola.

Amostra	Liaison® Rubella IgG II (DiaSorin)	VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux)	Resultado IB
76	0,68 UI/mL	2 UI/mL	Positiva
135	0,27 UI/mL	0 UI/mL	Positiva

As quatro amostras consideradas equívocas pelo IB (amostra 41, 91, 92 e 121) tinham sido negativas pelos dois imunoenaios comerciais. Os títulos encontram-se representados na tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados equívocos com o *immunoblot*

Amostra	Liaison® Rubella IgG II (DiaSorin)	VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux)	Resultado IB
41	<0,20 UI/mL	0 UI/mL	Equívoca
91	3,94 UI/mL	0UI/mL	Equívoca
92	<0,20 UI/mL	0 UI/mL	Equívoca
121	1,66UI/mL	2UI/mL	Equívoca

Estes resultados equívocos pelo IB foram justificados anteriormente, no entanto, caso tivesse sido feita a repetição do ensaio possivelmente as amostras 41 e 92 iriam ser consideradas negativas, uma vez que todos os IB com estes títulos foram negativos.

Os imunoenaios comerciais utilizados no CMLGS estão referenciados como tendo uma especificidade de 100%, no entanto, a sua sensibilidade é variável. A discrepância entre resultados obtidos no IB e nos imunoenaios comerciais tem sido amplamente descrita (4,6,7,43). Uma das principais razões é o facto de os vários testes usarem diferentes *cut-offs* para definição da seropositividade da rubéola. Assim, o valor que delimita a imunidade no caso do Liaison® Rubella IgG (DiaSorin) é 10UI/mL, mas no VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux) é 15UL/mL. Estes valores para definir a imunidade contra o vírus da rubéola foram determinados com base no teste de inibição de hemaglutinação nos anos 80. Está descrito que, com este teste, existe a possibilidade de reações falsas positivas e não permite diferenciar títulos baixos devido à presença de inibidores de aglutinação não específicos. Com a diminuição do vírus selvagem em circulação, os níveis de anticorpos têm diminuído com o tempo e, por isso, os resultados seronegativos podem encontrar-se sobrestimados devido a uma definição errónea do *cut-off*.

É importante estabelecer novos *cut-off* para os imunoenaios comerciais de forma a melhorar a correlação qualitativa entre ensaios. A padronização para estabelecer *cut-offs* específicos poderá ser alcançada analisando um elevado número de amostras IgG negativas para a rubéola. Neste estudo, apesar da baixa amostragem foi possível obter resultados positivos com IB de forma consistente a partir dos títulos 1,52 UI/ml e 2UI/mL, com o Liaison® Rubella IgG (DiaSorin) e o VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), respetivamente.

As discrepâncias encontradas podem ainda ser justificadas com as variações nos princípios de cada um dos imunoenaios comerciais. O resumo das diferenças entre estes encontra-se descrito na tabela 3.

**Tabela 3.** Diferenças entre imunoenaios comerciais (56,57)

Imunoensaio comercial	Tipo fase-sólida	Antigénio	Sistema de deteção	Conjugado
Liaison® Rubella IgG	Partículas magnética	Partícula viral inativada da rubéola (estirpe HPV77)	Quimiluminescência indireta	Anticorpo conjugado isoluminol
VIDAS® RUB IgG II	Recetáculo (SPR®)	Antigénio da rubéola (estirpe MR 383)	<i>Enzyme Linked Fluorescent Fluorant</i> (ELFA)	Anticorpo monoclonal conjugado com fosfatase

Com base nestas diferenças, os resultados quantitativos e a sua interpretação podem ser discordantes para o mesmo soro. Estas discrepâncias foram confirmadas em vários estudos (42,55,58). Isto pode levar a revacinações desnecessárias em indivíduos já imunes e a casos de falsas seroconversões em indivíduos com títulos baixos de IgG, como já referido anteriormente.

Deve ter-se ainda em consideração que apesar do elevado número de resultados negativos apresentados pelos imunoenaios comerciais, não têm sido descritos surtos de rubéola, reforçando a ideia de que a maior parte da população se encontra imunizada.

Os últimos surtos descritos na Europa ocorreram na Roménia e na Polónia e afetaram principalmente indivíduos do sexo masculino, uma vez que a estratégia de vacinação incidia no sexo feminino (20,23). Também no Japão foi descrita uma epidemia, mas tal como nas situações anteriores, o maior número de casos de rubéola ocorreu em homens não vacinados (24).

Os resultados do nosso estudo demonstram que aproximadamente 95% (138 amostras) das mulheres consideradas suscetíveis (resultado negativo no imunoensaio) eram seropositivas para o vírus da rubéola, pois apresentavam anti-E1 positiva no IB. Este resultado está de acordo com o descrito pelas equipas de Vauloup-Fellous e de Panning (6,7,43). Estas mulheres têm forte evidência de exposição ao vírus da

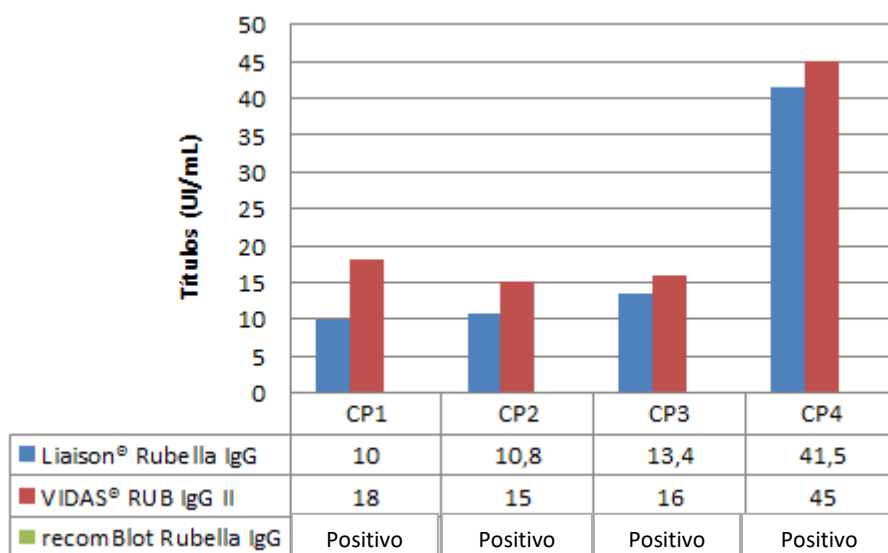
rubéola, no entanto, é importante perceber se, de facto, esses títulos muito baixos (interpretados como negativos/equívocos pelos imunoensaios comerciais) protegem contra a infeção.

De uma forma geral, as amostras analisadas apresentaram títulos baixos. No Liaison® Rubella IgG (DiaSorin) os títulos variaram entre <0,20 e 12,2UI/mL e com o VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux) entre 0 e 23UI/mL. Títulos relativamente baixos podem estar associados a casos de reinfeção, mas os poucos estudos publicados sobre reinfeções não o descrevem e são estudos realizados há mais de 20 anos. Não se sabe a frequência com que estes casos ocorrem, mas parece tratar-se de uma situação pouco frequente (59–61).

#### 4.4 Controlos positivos

Para além das 146 amostras com resultados negativos/equívocos provenientes do CMLGS, que constituíram o núcleo do presente estudo, foram ainda recebidas quatro amostras com resultados positivos. No teste Liaison® Rubella IgG (DiaSorin) os títulos destas amostras variaram entre os 10 e os 41,50UI/mL e no VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), entre os 15 e os 45UI/mL. As idades variaram entre os 21 e os 38.

O IB confirmou os resultados positivos obtidos nos imunoensaios, tendo sido consideradas como controlos positivos do nosso procedimento (figura 19).

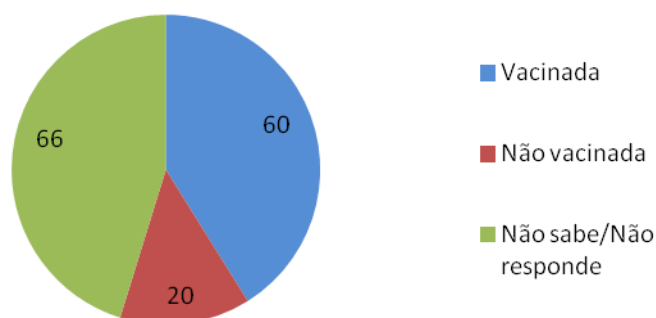


**Figura 19.** Resultados obtidos nas quatro amostras positivas, aqui designadas de controlos positivos (CP)

#### 4.5 Vacinação

A maior preocupação da infeção por rubéola é o risco de transmissão para o feto e em consequência o desenvolvimento SRC. O controlo e prevenção da rubéola baseiam-se na vacinação.

Neste estudo, 60 mulheres afirmaram estar vacinadas (41%), 20 mulheres afirmaram não estar vacinadas (14%) e as restantes 66 não sabe/não responde (45%) (figura 20). No entanto, nenhuma apresentou provas documentadas do estado de vacinação.



**Figura 20.** Situação/estado vacinal da população em estudo

É de ressaltar que um número considerável de mulheres afirmou não estar vacinada, esta situação pode ser justificada pela origem geográfica, uma vez que existem países onde ainda não está implementada a vacina contra a rubéola e por subsistirem grupos anti-vacinas.

Quando se compararam os resultados obtidos pelo IB e as respostas ao estado da vacinação foi possível observar que dos 24 resultados negativos no IB, 15 não sabe/não responde se estão imunizadas, 8 não estão vacinadas e apenas 1 diz estar vacinada. Considerando os resultados equívocos apenas 1 diz não estar vacinada e as restantes 3 não sabe/não responde. No que diz respeito aos resultados positivos, a maioria (59) diz estar vacinada, 48 não sabe/não responde e 11 mulheres dizem não estar vacinadas (tabela 4).

**Tabela 4.** Comparação entre resultados obtidos por IB e estado vacinal

Resultados IB	Vacinadas	Não Vacinadas	Não sabe/não responde
Negativos	1	8	15
Equívocos	0	1	3
Positivos	59	11	48

Em função destes resultados verificamos que apenas uma mulher afirma estar vacinada, e o IB foi negativo. Ao analisar os resultados deste soro obtidos com os imunoenaios comerciais verificou-se que os títulos foram <0,20 UI/mL e 0 para o Liaison<sup>®</sup> Rubella IgG (DiasSorin) e VIDAS<sup>®</sup> RUB IgG II (bioMérieux), respetivamente. Não temos documentado o histórico vacinal, mas se de facto estiver vacinada, o IB poderá não ter sido sensível ou pode haver complicações do foro imunológico. No entanto tendo em conta os

resultados dos três testes, não pode ser considerada imune ao vírus da rubéola e deve ser vacinada novamente.

Os 8 casos que dizem não estar vacinadas e cujos resultados foram negativos pelo IB, todos eles apresentaram títulos de <0,20 UI/mL e 0 para o Liaison® Rubella IgG (DiasSorin) e VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), respectivamente. Estes 8 casos devem ser considerados como não imunes e devem ser vacinadas assim que possível. O mesmo conselho deverá ser dado aos restantes 15 mulheres que não sabem se estão vacinadas e que o resultado do IB deu negativo e os títulos variaram entre <0,20 e 1,32UI/mL, no Liaison® Rubella IgG (DiasSorin), e foram 0UI/mL, no VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux).

Nos 4 resultados equívocos por IB, no caso em que a participante disse que não tinha sido vacinada, também teve títulos de <0,20UI/mL e 0 para o Liaison® Rubella IgG (DiasSorin) e VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), respectivamente. E nos outros três que não sabiam o estado vacinal, os títulos variaram entre <0,20 e 3,94UI/mL no Liaison® Rubella IgG (DiasSorin) e entre 0 e 2UI/mL no VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), sendo recomendado vacinar todas.

Nos 118 resultados positivos no IB, 59 afirmam estar vacinadas. No entanto, com o Liaison® Rubella IgG (DiasSorin), 57 foram negativos com títulos entre 2,03 e 9,68UI/mL e dois foram positivas com este teste com títulos de 10,20 e 10,30UI/mL. Com o VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), 34 foram negativas com títulos entre 3 e 9UI/mL, três foram positivas com títulos entre 16 e 19UI/mL e as restantes 22 foram equívocas com títulos entre 10 e 14UI/mL. Todas elas podem ser consideradas imunes, uma vez que o IB foi positivo, mesmo nos títulos relativamente baixos, não sendo necessária vacinação.

Nos 11 casos em que as participantes afirmaram não estar vacinadas, mas os resultados do IB foram positivos, os resultados dos imunoensaios comerciais foram todos negativos pelo Liaison® Rubella IgG (DiasSorin), com títulos entre 0,68 e 9,74UI/mL e 8 deles negativos pelo VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux) (títulos entre 2 e 9UI/mL), os restantes casos, 1 foi positivo com um título de 16UI/mL e os outros 2 foram equívocos com títulos de 10 e 13UI/mL. Com a informação disponível é difícil avaliar o motivo pelo qual estas mulheres apresentavam imunidade, mas deverá ter sido por uma das duas seguintes razões: ou por contato com o vírus selvagem, uma vez que há mais de 20 anos o vírus ainda poderia circular na comunidade, ou então foram vacinadas, mas não têm registos dessa vacinação e dessa forma afirmam que não foram vacinadas.

Os 48 casos que não sabem se estão vacinadas ou não responderam, mas têm IB positivo, com o Liaison® Rubella IgG (DiasSorin) 47 foram negativos com títulos entre 0,27 e 9,84UI/mL e 1 foi positiva com título de 12,2UI/mL, com o VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), 34 foram negativas com títulos entre 2 e 9UI/mL, 10 foram equívocas com título entre 10 e 14UI/mL e 4 foram positivas com títulos entre 15 e 23UI/mL. Nestes casos, com base nos resultados do IB, poderá ser evitada a vacinação.

Como esperado existe associação entre “não vacinadas” e resultados negativos com o IB quando comparado com “vacinado” e resultados negativos com IB (Fisher  $p < 0.001$ ).

Atualmente em Portugal a Norma 022/2017 da Direção Geral de Saúde (DGS) estabelece que “Para administrar VASPR a mulheres em idade fértil que não estejam vacinadas com 2 doses de vacina contra a rubéola não é necessária a determinação prévia de anticorpos” (62). Assim, das 146 mulheres avaliadas neste estudo, 20 afirmaram não estar vacinadas pelo que neste grupo a realização dos imunoenaios comerciais teria sido desnecessária. No entanto, ao analisar os resultados do IB das 20 que afirmaram não estar vacinadas, 11 encontram-se efetivamente imunizadas.

A Norma estabelece ainda que é considerada “...prova de imunidade: 2doses de vacina contra a rubéola ou serologia atestando imunidade contra a rubéola” (62). Assim, das 146 mulheres, 60 afirmaram estar vacinadas, pelo que neste sentido, com a aplicação da Norma, a avaliação serológica da rubéola também não seria necessária neste grupo. De fato, 59 destas encontram-se imunizadas, tendo em conta os resultados do IB, apenas uma teve resultado negativo, justificado anteriormente.

É interessante averiguar se os dados obtidos nos IB e os títulos dos imunoenaios comerciais se correlacionam com a administração de 1 ou 2 doses de vacina e com a data da última vacinação. Se assumirmos que a população em estudo é oriunda de Portugal (dado não disponível) e tivermos em consideração a data de implementação da vacina para a rubéola (que ocorreu em 1984) e os diferentes planos de vacinação que foram implementados no nosso país, poderemos categorizar a nossa amostra em diferentes grupos (tabelas 5). Neste sentido a população em estudo foi agrupada em função da data em que terá sido vacinada, nº doses possivelmente administradas e resultados obtidos nos 3 testes. Assim, no plano A foi incluída a mulher abrangida pelo 1º plano de vacinação realizado em Portugal e que administrou uma dose às mulheres suscetíveis; no plano B incluiu-se todas as adolescentes vacinadas com uma dose aos 11-13 anos; no plano C englobou-se as que foram imunizadas com duas doses, uma aos 15 meses e outra aos 10-13 anos; no plano D foram inseridas as aquelas em que foi administrada a primeira dose aos 12/15 meses e a segunda dose aos 5-6anos.

**Tabela 5.** Distribuição da população em estudo de acordo com o plano de vacinação, os resultados do IB e dos imunoenaios comerciais.

Plano	Idade	Nº dose	Nº indivíduos	IB			Liaison®		VIDAS®		
				Neg	Equi	Pos	<10UI/mL	≥10UI/mL	<10UI/mL	10-14UI/mL	≥15UI/mL
A	57	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
B	34-43		27	11	1	15	26	1	23	3	1
C	26-33	2	75	8	1	66	74	1	46	24	5
B	16-25		43	4	2	37	42	1	34	7	2

Neg- negativo; equi-equívoco, pos- positivo

A maioria (51%) da nossa população encontra-se no plano C, terá sido imunizada com duas doses, a última das quais há mais de 14 anos, mas menos de 21 anos. Destas, segundo os resultados do IB, 66 (88%) ainda se encontram imunizadas.

No plano D temos 29,5% das mulheres que terão sido vacinadas com duas doses, a segunda há mais de 10 anos, mas menos de 19 anos, nestas 86% apresentaram bandas no IB compatíveis com presença de IgG para a rubéola.

Uma minoria (18,5%) foi abrangida pelo plano B, no qual só foi administrada uma dose aos 11-13 anos, isto é, estas mulheres foram imunizadas há menos de 31 anos, mas há mais de 22 anos. Destas, cerca de metade (41%) já não se encontra imunizada segundo o IB.

A mulher com 57 anos, inserida no plano A, terá sido vacinada por volta dos 22 anos, isto é, aproximadamente há 35 anos. O resultado do IB mostraram que já não se encontra imunizada. Globalmente e considerando o IB, a população (81%) encontra-se imunizada independentemente do plano com que terá sido imunizada.

Quanto aos títulos obtidos com os 2 imunoenaios comerciais, verificamos que a maioria da população, 98% e 71%, encontra-se negativa, respetivamente, com o Liaison® Rubella IgG (DiasSorin) e VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), não existindo diferenças em função do plano de vacinação a que terão sido sujeitas.

Relativamente aos resultados do VIDAS e considerando a definição de *cut-off* de positividade segundo a OMS, isto é, títulos ≥10UI/mL deverão considerados positivos, 39% das mulheres abrangidas pelo plano C e 21% do plano D estão imunizadas.

Seguindo este mesmo critério da OMS, as mulheres imunizadas com apenas uma dose tiveram uma taxa de imunização menor, 15%, *versus* os 32% das que foram vacinadas com duas doses.

#### 4.6 Custos

Cada vez mais está a aumentar a população vacinada com resultados negativos ou equívocos por imunoensaios comerciais e por isso considerados suscetíveis à rubéola. Estes indivíduos são vacinados ou revacinados desnecessariamente e quando as amostras são testadas em laboratórios que utilizam imunoensaios comerciais com diferentes sensibilidades e especificidades leva a determinações incorretas do estado imunitário. Esta situação torna-se ainda mais importante nas mulheres em idade fértil ou grávidas. É essencial clarificar a situação e definir o *cut-off*.

Neste estudo, os valores apresentados tiveram em consideração os valores de referência das casas comerciais, isto é, só foram definidos como positivos títulos  $\geq 15\text{UI/mL}$ .

O custo envolvido na realização das 146 determinações do estado imunitário para o vírus da rubéola foi de 394,2€ utilizando o Liaison® Rubella IgG (DiaSorin). Das 146 amostras, 143 foram negativas e 3 positivas, mas com um título baixo, obrigando à confirmação de todos os resultados pelo VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux), envolvendo um custo adicional de 861,4€, isto é, no total para cada amostra foi despendido o valor de 8,6€. Após a realização do teste confirmatório, 138 amostras foram consideradas negativas e oito positivas, o que implica a administração de pelo menos uma dose de vacina, dependendo do estado vacinal, a 138 mulheres. Em Portugal, uma dose de VASPR custa 6,30€, no entanto para um indivíduo ser considerado imune são necessárias duas doses, assim, destas 138 mulheres, 81 não estão vacinadas, não sabem/não responderam, o que implica a vacinação com duas doses, e 57 estão vacinadas pelo que só necessitam de uma dose, no total o valor gasto é 1.379,7€.

Considerando os valores apresentados, o custo associado à determinação do estado imunitário e imunização para a rubéola das 146 mulheres que constituíram a população em estudo foi de 2.635,3€.

Deve ainda ter-se em consideração, que se a determinação de imunidade for realizada no 1º trimestre da gravidez e os resultados forem negativos/equívocos, os imunoensaios comerciais iriam ser repetidos no 2º trimestre (18-20 semanas), aumentando consideravelmente o valor, no entanto no nosso estudo não temos informação sobre esse dado.

Se na avaliação do estado imunitário se tivesse utilizado apenas o IB o valor envolvido teria sido 3.504€ ao que se acrescentaria 344,4€ referente à vacinação das 28 mulheres (24 com resultado negativo e quatro com equívoco), com duas doses de vacina, porque 27 referiram não estar vacinadas ou não sabem/não responderam e uma, embora tenha dito estar vacinada, os resultados dos três testes mostraram não estar imunizada.

Os valores anteriormente apresentados mostram que a estratégia atualmente seguida na determinação do estado imunitário para a rubéola (utilização dos imunoensaios comerciais) é economicamente mais rentável, embora os nossos resultados indiquem que 81% das mulheres analisadas estão imunizadas (falsos negativos dos imunoensaios comerciais).

Estes dados mostram que estas mulheres não necessitam de vacinação e, como estas determinações são dirigidas maioritariamente a mulheres grávidas, evita-se a comunicação de resultados negativos/equívocos que originam *stress* materno por estarem associados a um risco de infeção da mãe e consequente transmissão ao feto porque, apesar de em Portugal a doença estar com estatuto de eliminação desde 2015, deve ter-se em consideração que em alguns países europeus, tais como, a França, Itália, Bulgária e Polónia, as taxas de cobertura vacinal são relativamente baixas e dado a atual globalização a possibilidade de contato com o vírus é real. Como anteriormente já foi referido, têm sido descritos surtos de rubéola, sendo que, entre julho de 2018 e junho de 2019, foram notificados 483 casos de rubéola na Europa (25).

Tendo ainda em conta a Norma 022/2017 da DGS referida anteriormente, se esta tivesse sido aplicada na nossa população em estudo, os valores teriam diminuído consideravelmente. Assim, das 146 mulheres, 60 afirmam estar vacinadas (sendo necessário documentos comprovativos) não sendo necessária a realização dos testes serológicos nem administração da vacina. As 20 mulheres que afirmaram não estar vacinadas, seriam imunizadas com duas doses de vacina contra a rubéola (252€), não sendo necessária a determinação prévia de anticorpos.

Assim, apenas 66 mulheres deveriam ter realizado a determinação do estado imunitário. Ao realizar os imunoensaios comerciais o valor gasto seria de 567,6€ e imunização 831,6€. Com o IB o valor seria de 1584€, mas apenas 18 mulheres seriam vacinadas (226,8€), evitando a revacinação de 48 mulheres.

Devemos ter em conta que nesta avaliação de custos não estão envolvidos outros valores como os relativos a recursos humanos, seringas ou material de laboratório.

## 5 Conclusão e perspectivas futuras

A determinação do estado imunitário para o vírus da rubéola é efetuada atualmente por imunoenaios comerciais, estando disponíveis no mercado diferentes opções. Todas elas se encontram calibradas com o Padrão Internacional da OMS e os resultados quantitativos são dados em UI/mL sugerindo que resultados obtidos podem ser comparados. No entanto, tem-se verificado que tal não acontece, isto é, que o mesmo soro apresenta títulos muito discrepantes quando analisado com testes diferentes (6,7,10).

O IB é um teste de referência para a determinação do estado imunitário. No nosso estudo este teste foi utilizado para confirmação qualitativa dos resultados obtidos com os imunoenaios comerciais utilizados no CMLGS. Os resultados demonstram que com o IB se obtêm um número de positivos muito superior (118), enquanto que com o Liaison® Rubella IgG (DiaSorin) apenas houve 3 e 8 com o VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux). O IB permitiu ainda a confirmação de 24 verdadeiros-negativos. Entre as 146 amostras analisadas apenas 4 apresentaram resultados equívocos, devido à dificuldade de leitura. Este estudo, em conjunto com estudos anteriores, demonstrou que os valores baixos de IgG obtidos nos imunoenaios comerciais confirmam ser verdadeiros positivos com o IB e conseqüentemente indicam que a mulher está protegida contra a rubéola evitando, assim, revacinações e *stress* em mulheres grávidas. Resultados falsos-negativos têm também impacto nas determinações de seroprevalência importantes na eliminação da rubéola.

Para além disso, o nosso estudo vem confirmar que remover a zona cinzenta dos imunoenaios comerciais e considerar esses resultados positivos permite uma maior concordância entre estes e o IB, isto pode indicar a necessidade de uma nova definição do limite que estabelece o estado imunitário para a rubéola.

Relativamente ao estado vacinal, das 60 mulheres que afirmaram estar vacinadas, 59 tiveram resultado positivo com o IB, no entanto com os imunoenaios comerciais os resultados não foram consistentes, sendo por isso consideradas suscetíveis. Isto leva a revacinações e custos desnecessários.

Os nossos resultados mostram igualmente que se a Norma 022/2017 da DGS fosse adequadamente implementada na rotina estas situações seriam evitadas, dado que não se realizariam testes serológicos a mulheres vacinadas. A Norma estabelece que não é necessária a determinação prévia do estado imunitário para que a VASPR seja administrada a mulheres sem as 2 doses de vacina e para além disso, considera prova de imunidade a administração de 2 doses de vacina contra a rubéola ou serologia atestando imunidade contra a rubéola. Acrescenta, ainda, que as mulheres em idade fértil poderão ser vacinadas no máximo com três doses, se apresentarem prescrição fundamentada pela serologia negativa, mas os nossos resultados mostraram que os imunoenaios comerciais originam um importante número de falsos negativos. Deve, no entanto, ser lembrado que neste estudo apenas se incluiu um pequeno número de

amostras que tinham sido positivas pelos testes serológicos de rotina, que são a grande maioria dos testes realizados num laboratório de rotina.

Portugal ostenta o título de país com eliminação da rubéola, desde 2015, contudo devem continuar a ser tomadas devidas precauções, essencialmente em mulheres em idade fértil numa fase pré-concepcional ou mesmo durante a gravidez.

Num futuro próximo é essencial definir um novo limite de positividade para a rubéola, recalibrando os imunoensaios comerciais de forma rigorosa para definir verdadeiros negativos e positivos. É também importante perceber se existem efeitos secundários numa 3ª dose de vacina e se o título se mantém ou se diminui, voltando a valores basais rapidamente. A aplicação do IB em casos selecionados, nomeadamente nos casos em que o estado vacinal é desconhecido e que os testes de rotina foram negativos ou equívocos, deverá ser um assunto de discussão alargado e multidisciplinar, envolvendo as autoridades de saúde.

## 6 Bibliografia

1. Banatvala JE, Brown DWG. Rubella. *Lancet*. 2004;363:1127–37.
2. Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe S, editores. Chapter 20: Rubella. Em: *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases* [Internet]. 13ª. Washington D.C. Public Health Foundation: Centers for Disease Control and Prevention; 2015 [citado 14 de junho de 2016]. p. 325–340. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/rubella.html>
3. WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection [Internet]. 2ª. Geneva: World Health Organization; 2007 [citado 14 de junho de 2019]. Disponível em: [http://www.who.int/ihr/elibrary/manual\\_diagn\\_lab\\_meas\\_rub\\_en.pdf](http://www.who.int/ihr/elibrary/manual_diagn_lab_meas_rub_en.pdf)
4. Vauloup-Fellous C. Standardization of rubella immunoassays. *J Clin Virol*. 2018;102:34–8.
5. Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 13th ed. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. 2015. p. 325–340
6. Picone O, Bouthry E, Bejaoui-Olhmann Y, Cordier AG, Nedellec S, Letourneau A, Carbonel M, Brollo M, Grangeot-Keros L, Ayoubi JM, Benachi A, Rouge E, Vauloup-Fellous C. Determination of rubella virus-specific humoral and cell-mediated immunity in pregnant women with negative or equivocal rubella-specific IgG in routine screening. *J Clin Virol*. 2019;112:27–33.
7. Bouthry E, Furione M, Huzly D, Ogee-Nwankwo A, Hao L, Adebayo A, Icenogle J, Sarasini A, Revello MG, Grangeot-Keros L, Vauloup-Fellous C. Assessing Immunity to Rubella Virus: a Plea for Standardization of IgG (Immuno)assays. *J Clin Microbiol*. 2016;54(7):1720–5.
8. WHO. 29ª Conferência sanitária pan-americana - Plano de ação para assegurar a sustentabilidade da eliminação do sarampo, rubéola e Síndrome da Rubéola Congênita nas Américas 2018-2023. Vol. 2000. 2017.
9. Dorsett PH, Miller DC, Green KY, Byrd FI. Structure and function of the Rubella Virus Proteins. *Rev Infect Dis*. 1985; Vol 7. p. 150-156
10. Dimech W, Grangeot-Keros L, Vauloup-Fellous C. Standardization of assays that detect anti-rubella virus IgG antibodies. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(1):163–74.
11. Palminha P, Vinagre E, Ribeiro C, Lourenço T. Rubéola congênita em Portugal entre 2009 e 2015. *Obs Bol Epidemiológico*. 2015;21-3.
12. Nedeljkovic J, Jovanovic T, Mladjenovic S, Hedman K, Peitsaro N, Oker-Blom C. Immunoblot analysis of natural and vaccine-induced IgG responses to rubella virus proteins expressed in insect cells. *J Clin*

*Virol.* 1999;14(2):119–31.

13. Lambert N, Strebel P, Orenstein W, Icenogle J, Poland GA. Rubella. *Lancet.* 2015;385(9984):356.
14. WHO. Rubella virus nomenclature update: 2013. *Wkly Epidemiol Rec.* 9 de Agosto de 2013;88(32):337–48. [citado 5 de julho de 2019]. Disponível em: <http://www.who.int/wer>
15. Byrne L, Brant L, Reynolds C, Ramsay M. Seroprevalence of low rubella IgG antibody levels among antenatal women in England tested by NHS Blood and Transplant: 2004-2009. Is rubella susceptibility increasing? *Vaccine.* 2012;30(2):161–7.
16. Robertson SE, Featherstone DA, Gacic-dobo M, Hersh BS. Rubella and congenital rubella syndrome : global update rubella syndrome in developing countries. *Am J Public Health.* 2003;14(5):306–15.
17. Best JM, O’shea S, Tipples G, Davies N, al-Khusaiby SM, Krause A, Heskeh LM, Jin L, Enders G. Interpretation of rubella serology in pregnancy—pitfalls and problems. *Bmj.* 2002;325(7356):147.
18. Hinman AR, Irons B, Lewis M, Kandola K. Economic analyses of rubella and rubella vaccines: A global review. *Bull World Health Organ.* 2002;80(4):264–70.
19. Isaac BM, Zucker JR, Giancotti FR, Abernathy E, Icenogle J, Rakeman JL, et al. Rubella Surveillance and Diagnostic Testing among a Low-Prevalence Population, New York City, 2012–2013. *Clin Vaccine Immunol.* 2017;24(9):2012–3.
20. Paradowska-Stankiewicz I, Czarkowski MP, Derrough T, Stefanoff P. Ongoing outbreak of rubella among young male adults in Poland: Increased risk of congenital rubella infections. *Eurosur.* 2013;18(21):20485.
21. Babigumira JB, Morgan I, Levin A. Health economics of rubella: A systematic review to assess the value of rubella vaccination. *BMC Public Health.* 2013;13(1).
22. Grant GB, Reef SE, Patel M, Knapp JK, Dabbagh A. Morbidity and Mortality Weekly Report Progress in Rubella and Congenital Rubella Syndrome Control and Elimination — Worldwide, 2000–2016. *Centers Dis Control Prev.* 2017;17(66):1256–60.
23. Janta D, Stanescu A, Lupulescu E, Molnar G, Pistol A. Ongoing rubella outbreak among adolescents in Salaj, Romania, September 2011-January 2012. *Eurosur.* 2012;17(7):1–4.
24. Minakami H, Kubo T, Unno N. Causes of a nationwide rubella outbreak in Japan, 2012-2013. *J Infect.* 2014;68(1):99–101.
25. European Centre for Disease Prevention and Control. Monthly measles and rubella monitoring

- report March 2019. *Surveill Rep.* 2019; 2018:1–9. [citado 30 de julho de 2019]. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Monthly-Measles-Rubella-monitoring-report-July-2018-1.pdf>
26. WHO. Rubella vaccines: WHO position paper—Recommendations. *Vaccine.* 2011;29(48):8767–8. [citado 30 de julho de 2019]. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11013077>
  27. Vynnycky E, Adams EJ, Cutts FT, Reef SE, Navar AM, Simons E, et al. Using seroprevalence and immunisation coverage data to estimate the global burden of Congenital Rubella Syndrome, 1996–2010: A systematic review. *PLoS One.* 2016;11(3):1996–2010.
  28. Direção Geral de Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 2012-2015. Direção-Geral de Saúde. 2016;l:1–82.
  29. Instituto Nacional de Estatística IP. Estatísticas da Saúde 2017. Edição 201. 2019.
  30. Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge. Sarampo e Rubéola mantêm-se eliminadas em Portugal 2018 [citado 11 agosto 2019]. Disponível em: <http://www.insa.min-saude.pt/sarampo-e-rubeola-mantem-se-eliminadas-em-portugal/>
  31. Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge. Inquério Serológico Nacional 2015-2016 - Doenças Evitáveis por vacinação. 2017.
  32. Pitts SI, Wallace GS, Montana B, Handschur EF, Meislich D, Sampson AC, et al. Congenital rubella syndrome in child of woman without known risk factors, New Jersey, USA. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(2):307–9.
  33. Augusto GF, Cruz D, Silva A, Pereira N, Aguiar B, Leça A, et al. Challenging measles case definition: Three measles outbreaks in three Health Regions of Portugal, February to April 2018. *Eurosurveillance.* 2018;23(28):1–6.
  34. World Health Organization. Global Measles & Rubella Strategic Plan. 2012;1–44. [citado 15 de agosto 2019]. Disponível em: [http://www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html)
  35. DGS. Programa Nacional de Eliminação do Sarampo. 2013;2012:31 [citado 30 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/programa-nacional-de-eliminacao-do-sarampo-jpg.aspx>
  36. LeBaron CW, Forghani B, Matter L, Reef SE, Beck C, Bi D, et al. Persistence of Rubella Antibodies after 2 Doses of Measles-Mumps-Rubella Vaccine. *J Infect Dis.* 2009;200(6):888–99.

37. Kontio M, Jokinen S, Paunio M, Peltola H, Davidkin I. Waning antibody levels and avidity: Implications for MMR vaccine-induced protection. *J Infect Dis.* 2012;206(10):1542–8.
38. Lai FY, Dover DC, Lee B, Fonseca K, Solomon N, Plitt SS, et al. Determining rubella immunity in pregnant Alberta women 2009-2012. *Vaccine.* 2015;33(5):635–41.
39. Gilbert NL, Rotondo J, Shapiro J, Sherrard L, Fraser WD, Ward BJ. Seroprevalence of rubella antibodies and determinants of susceptibility to rubella in a cohort of pregnant women in Canada, 2008-2011. *Vaccine.* 2017;35(23):3050–5.
40. Skendzel LP. Rubella immunity: Defining the level of protective antibody. *Am J Clin Pathol.* 1996;106(2):170–4.
41. Poethko-Müller C, Mankertz A. Seroprevalence of measles-, mumps- and rubella-specific IgG antibodies in German children and adolescents and predictors for seronegativity. *PLoS One.* 2012;7(8):1–13.
42. Enders M, Bartelt U, Knotek F, Bunn K, Strobel S, Dietz K, et al. Performance of the elecsys rubella IgG assay in the diagnostic laboratory setting for assessment of immune status. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(3):420–6.
43. Huzly D, Hanselmann I, Neumann-Haefelin D, Panning M. Performance of 14 rubella IgG immunoassays on samples with low positive or negative haemagglutination inhibition results. *J Clin Virol.* 2016;74:13–8.
44. O’Shea S, Best J, Banatvala J, Marshall W, Dudgeon J. Rubella vaccination: persistence of antibodies for up to 16 years. *Bmj.* 1982;285(6343):744–744.
45. Asahi T, Ueda K, Hidaka Y, Miyazaki C, Tanaka Y, Nishima S. Twenty-three-year follow-up study of rubella antibodies after immunization in a closed population, and serological response to revaccination. *Vaccine.* 1997;15(16):1791–5.
46. Christenson B, Böttiger M. Long-term follow-up study of rubella antibodies in naturally immune and vaccinated young adults. *Vaccine.* 1994;12(1):41–5.
47. Kremer JR, Schneider F, Muller CP. Waning antibodies in measles and rubella vaccinees - A longitudinal study. *Vaccine.* 2006;24(14):2594–601.
48. Davidkin I, Jokinen S, Broman M, Leinikki P, Peltola H. Persistence of Measles, Mumps, and Rubella Antibodies in an MMR-Vaccinated Cohort: A 20-Year Follow-up. *J Infect Dis.* 2008;197(7):950–6.
49. Kakoulidou M, Forsgren M, Lewensohn-Fuchs I, Johansen K. Serum levels of rubella-specific

- antibodies in Swedish women following three decades of vaccination programmes. *Vaccine*. 2010;28(4):1002–7.
50. Schmidt NJ, Lennette EH. Variables of the Rubella Hemagglutination-Inhibition Test System and Their Effect on Antigen and Antibody Titers. *Appl Microbiol*. 1970;19(3):491–504.
  51. Zhang T, Mauracher CA, Mitchell LA, Tingle AJ. Detection of rubella virus-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies by immunoblot assays. *J Clin Microbiol*. 1992;30(4):824–30.
  52. Pustowoit B, Liebert UG. Predictive value of serological tests in rubella virus infection during pregnancy. *Intervirology*. 1998;41(4–5):170–7.
  53. Cusi MG, Valassina M, Bianchi S, Wunner W, Valensin PE. Evaluation of rubella virus E2 and C proteins in protection against rubella virus in a mouse model. *Virus Res*. 1995;37(3):199–208.
  54. MIKROGEN Diagnostik. recom Blot Rubella IgG (instruções de utilização) [citado 15 agosto 2019]. Disponível em: <https://www.mikrogen.de/english/products/product-overview/testsystem/rubella-igg.html>
  55. Dimech W, Panagiotopoulos L, Francis B, Laven N, Marler J, Dickeson D, et al. Evaluation of eight anti-rubella virus immunoglobulin G immunoassays that report results in international units per milliliter. *J Clin Microbiol*. 2008;46(6):1955–60.
  56. DiaSorin. Liaison<sup>®</sup> Rubella IgG. 2013 [citado 15 agosto 2019]. p. 34–42. Disponível em: <http://www.annardx.com/productos/images/productos/diagnostica/infecciosas/liaison-rubella-igg-310720.pdf>
  57. bioMérieux, li I, Linked E, Assay F. VIDAS<sup>®</sup> RUB IgG II . 2016 [citado 15 agosto 2019]. p. 1–6. Disponível em: <https://www.fardavar.com/Upload/RUBG.pdf>
  58. Dimech W, Arachchi N, Cai J, Sahin T, Wilson K. Investigation into low-level anti-rubella virus IgG results reported by commercial immunoassays. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(2):255–61.
  59. Braun C, Kampa D, Fressle R, Willke E, Stahl M, Haller O. Congenital rubella syndrome despite repeated vaccination of the mother: a coincidence of vaccine failure with failure to vaccinate. *Acta Paediatr*. 1994;83(6):674–7.
  60. Wolf J, Eisen J, Fraimow H. Symptomatic Rubella Reinfection in an Immune Contact of a Rubella Vaccine Recipient. *Case Reports*. 1993;
  61. Hutton J, Rowan P, Greisinger A, Mouzoon M. Rubella monitoring in pregnancy as a means for evaluating a possible reemergence of rubella. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;211(5):534.e1-534.e4.

62. Direção Geral de Saúde. Programa Nacional de Vacinação 2017 - Vacinação contra a rubéola de mulheres em idade fértil. 2017;1-5. [citado em 25 de Setembro de 2019] Disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0222017-de-19102017-pdf.aspx>

# Anexos

**Decisão final sobre o projecto "Determinação do estado imunitário para a rubéola em grávidas com IgG duvidosa ou negativa"**

A Comissão de Ética da NMS|FCM-UNL (CEFCM) decidiu, por unanimidade, aprovar o projecto de investigação intitulado "*Determinação do estado imunitário para a rubéola em grávidas com IgG duvidosa ou negativa*" (nº16/2019/CEFCM), submetido por Prof. Doutor Paulo Paixão.

Lisboa, 17 de Maio de 2019

O Presidente da Comissão de Ética,



(Prof. Doutor Diogo Pais)

**TO WHOM IT MAY CONCERN**

The Ethics Research Committee NMS|FCM-UNL (CEFCM) has unanimously approved the Project entitled "*Determinação do estado imunitário para a rubéola em grávidas com IgG duvidosa ou negativa*" (nr.16/2019/CEFCM), submitted by Paulo Paixão, MD, PhD .

Lisbon, May 17<sup>th</sup>, 2019

The Chairman of the Ethics Research Committee,



(Diogo Pais, MD, PhD)

**Anexo B.** Resultados obtidos pelo IB (recomBlot rubella IgG (Mikrogen) e nos imunoenaios comerciais (Liaison® Rubella IgG (DiaSorin) e VIDAS® RUB IgG II (bioMérieux)) e estado vacinal

Amostra	Idade	Immunoblot				Resultados CMLGS				Estado Vacinal	
		Qualitativo	Bandas antigénicas			Liaison®		VIDAS®			
			E1-E2	c	E1	E2	Qualitativo	Quantitativo	Qualitativo		Quantitativo
CP			+	+	+	+					
1	41	Pos	+	+	+	-	Neg	5.22	Neg	9	Não responde
2	24	Pos	+	-	+	+	Neg	6.63	Neg	9	Sim
3	35	Pos	+	-	+	-	Neg	2.25	Neg	4	Não sabe
4	40	Pos	+	-	+	-	Neg	3.12	Neg	6	Não responde
5	32	Pos	+	-	+	+	Neg	9.05	Pos	16	Sim
6	24	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não responde
7	30	Pos	+	-	+	-	Neg	6.23	Equi	12	Sim
8	28	Pos	+	-	+	-	Neg	8.22	Equi	10	Sim
9	24	Pos	+	-	+	+	Neg	5.11	Neg	9	Não
10	32	Pos	+	-	+	-	Neg	3.23	Neg	4	Sim
11	27	Pos	+	-	+	-	Neg	4.72	Neg	8	Sim
12	31	Pos	+	-	+	-	Neg	6.75	Equi	12	Sim
13	26	Pos	+	-	+	-	Neg	4.26	Neg	5	Sim
14	32	Pos	+	-	+	-	Neg	3.65	Neg	6	Sim
15	26	Pos	+	-	+	+	Neg	6.54	Equi	10	Não sabe
16	34	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não sabe
17	32	Pos	-	-	+	-	Neg	6.80	Neg	7	Não
18	23	Pos	+	-	+	-	Neg	7.50	Equi	14	Sim
19	30	Pos	-	+	+	-	Neg	1.52	Neg	2	Não responde
21	24	Pos	+	-	+	+	Neg	6.82	Neg	8	Não responde
22	28	Pos	+	-	+	-	Neg	8.81	Pos	16	Sim
23	30	Pos	+	-	+	-	Neg	8.14	Equi	13	Não
24	16	Pos	+	-	+	-	Neg	4.50	Neg	5	Não responde
25	31	Pos	+	-	+	+	Neg	8.39	Neg	9	Sim
26	27	Pos	+	-	+	-	Neg	4.82	Neg	6	N/sabe
27	19	Pos	+	-	+	-	Neg	2.63	Neg	4	Sim
28	33	Pos	+	-	+	-	Neg	9.08	Equi	10	Não responde
29	21	Pos	+	-	+	-	Neg	4.93	Neg	6	Não responde
30	25	Pos	+	-	+	+	Neg	8.70	Neg	8	Não responde
31	36	Pos	+	-	+	-	Neg	5.37	Neg	7	Não
32	29	Pos	+	+	+	+	Neg	6.08	Neg	5	Sim
33	28	Pos	+	+	+	-	Neg	7.45	Equi	13	Não responde
34	27	Pos	-	-	+	-	Neg	2.75	Neg	4	Sim
35	32	Pos	+	-	+	-	Pos	12.2	Neg	9	Não responde
36	35	Pos	+	-	+	+	Neg	9.68	Equi	12	Sim
38	25	Pos	+	-	+	-	Neg	4.64	Neg	8	Não responde
39	27	Pos	+	-	+	-	Neg	5.13	Equi	11	Não
40	33	Pos	+	-	+	+	Neg	8.24	Neg	9	Sim
41	20	Equi					Neg	<0.20	Neg	0	Não
42	29	Pos	+	-	+	-	Neg	9.75	Pos	23	Não responde
43	31	Pos	+	-	+	-	Neg	6.80	Equi	14	Sim
44	27	Pos	-	-	+	-	Neg	6.75	Equi	13	Sim

45	27	Pos	-	-	+	-	Neg	3.10	Neg	3	Sim
46	21	Pos	+	-	+	-	Neg	2.85	Neg	6	Sim
47	29	Pos	-	-	+	-	Neg	3.91	Equi	10	Sim
48	22	Pos	-	-	+	-	Neg	2.83	Neg	4	Sim
49	25	Pos	-	-	+	-	Neg	1.83	Neg	4	Não responde
50	38	Pos	-	-	+	+	Neg	3.96	Neg	4	Não responde
51	28	Neg	-	-	-	-	Neg	<0,20	Neg	0	Não sabe
52	31	Pos	+	-	+	-	Neg	6.94	Neg	8	Sim
53	35	Pos	-	-	+	+	Neg	5.89	Neg	9	Não
54	22	Pos	-	-	+	-	Neg	2.89	Neg	5	Sim
55	27	Pos	-	-	+	-	Neg	4.91	Neg	6	Sim
57	57	Neg	-	-	-	-	Neg	1.32	Neg	0	Sem contacto
58	24	Pos	-	-	+	-	Neg	3.11	Neg	2	Sem contacto
59	33	Pos	-	-	+	-	Neg	2.95	Neg	4	Não sabe
61	22	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Sim
62	22	Pos	+	-	+	-	Neg	8.69	Neg	9	Não
63	16	Pos	+	-	+	+	Neg	9.74	Pos	16	Não
64	23	Pos	+	-	+	-	Neg	8.88	Equi	14	Sim
65	31	Pos	+	-	+	+	Neg	4.80	Neg	4	Sim
66	20	Pos	+	-	+	-	Neg	2.03	Neg	4	Sim
67	33	Pos	+	-	+	-	Neg	8.95	Equi	12	Sim
68	17	Pos	-	-	+	-	Neg	3.24	Neg	4	Sim
69	32	Pos	+	-	+	-	Neg	7.85	Equi	11	Sim
70	21	Pos	+	-	+	-	Neg	5.98	Neg	8	Não responde
71	37	Pos	-	-	+	-	Neg	4.05	Neg	5	Não responde
72	43	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não
73	25	Pos	+	-	+	+	Neg	6.07	Neg	9	Sim
74	43	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não responde
75	38	Pos	+	-	+	-	Neg	9.27	Equi	13	Sim
76	31	Pos	-	-	+	+	Neg	0.68	Neg	2	Não
77	33	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não sabe
78	37	Pos	+	-	+	+	Pos	10.30	Neg	6	Sim
79	27	Pos	-	-	+	-	Neg	5.57	Neg	9	Não responde
81	22	Pos	+	-	+	-	Pos	10.20	Equi	10	Sim
82	24	Pos	-	-	+	-	Neg	7.61	Equi	11	Não responde
83	28	Pos	+	-	+	-	Neg	7.01	Pos	15	Não responde
84	23	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não sabe
85	29	Pos	+	-	+	+	Neg	8.89	Equi	14	Sim
86	29	Pos	-	-	+	+	Neg	7.59	Neg	9	Não sabe
87	29	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não responde
88	29	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não responde
89	31	Pos	+	-	+	-	Neg	7.38	Neg	8	Sim
90	25	Pos	+	-	+	-	Neg	6.38	Equi	10	Sim
91	42	Equi	-	-	-	-	Neg	3.94	Neg	0	Não sabe
92	22	Equi	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não sabe
93	36	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não sabe
94	24	Pos	+	-	+	-	Neg	5.17	Neg	7	Não sabe
95	33	Pos	+	-	+	-	Neg	6.63	Equi	11	Não responde
96	30	Pos	+	-	+	+	Neg	6.51	Neg	7	Não responde
97	30	Pos	+	-	+	+	Neg	9.64	Equi	11	Não sabe

98	35	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não sabe
99	37	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não responde
100	31	Pos	+	-	+	-	Neg	6.16	Neg	9	Sim
101	20	Pos	+	-	+	-	Neg	8.29	Neg	8	Não responde
102	33	Pos	+	-	+	-	Neg	4.30	Neg	9	Sim
103	26	Pos	-	-	+	-	Neg	5.48	Neg	6	Não responde
104	42	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não
105	23	Pos	+	-	+	-	Neg	3.94	Neg	5	Sim
106	25	Pos	+	-	+	-	Neg	8.44	Equi	12	Sim
107	31	Pos	+	-	+	-	Neg	4.85	Equi	11	Sim
108	32	Pos	+	-	+	-	Neg	3.72	Neg	6	Sim
109	40	Pos	+	-	+	+	Neg	8.23	Neg	5	Não responde
110	22	Pos	+	-	+	+	Neg	7.11	Neg	9	Não responde
111	38	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não responde
112	28	Pos	+	-	+	-	Neg	2.94	Neg	4	Sim
113	31	Pos	+	-	+	-	Neg	7.09	Equi	13	Não sabe
114	23	Pos	+	-	+	-	Neg	4.81	Neg	5	Sim
115	34	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não
116	38	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não
117	30	Pos	+	-	+	-	Neg	5.87	Equi	12	Sim
118	29	Pos	+	-	+	+	Neg	3.92	Neg	8	Sim
119	33	Pos	+	-	+	+	Neg	2.33	Neg	6	Não sabe
120	31	Pos	+	-	+	+	Neg	3.66	Neg	6	Sim
121	26	Equi	-	-	+	+	Neg	1.66	Neg	2	Não sabe
122	32	Pos	+	-	+	-	Neg	5.89	Neg	8	Não responde
123	29	Pos	+	-	+	-	Neg	4.1	Neg	6	Não responde
124	23	Pos	+	-	+	-	Neg	3.09	Neg	8	Sim
125	39	Pos	+	-	+	-	Neg	2.56	Neg	8	Sim
126	26	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não responde
127	43	Pos	-	-	+	-	Neg	8.91	Pos	20	Não responde
128	22	Pos	-	-	+	-	Neg	2.88	Neg	4	Sim
129	29	Pos	+	-	+	-	Neg	9.37	Equi	13	Sim
130	29	Pos	+	-	+	-	Neg	6.42	Equi	10	Não responde
131	32	Pos	+	-	+	-	Neg	6.47	Neg	8	Sim
132	23	Pos	+	-	+	-	Neg	7.31	Equi	13	Sim
133	27	Pos	+	-	+	-	Neg	7.38	Equi	14	Não responde
134	41	Pos	-	-	+	-	Neg	7.19	Equi	11	Não sabe
135	34	Pos	-	-	+	-	Neg	0.27	Neg	0	Não responde
136	30	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.20	Neg	0	Não
137	19	Pos	+	-	+	-	Neg	8.67	Pos	19	Sim
138	33	Pos	-	-	+	+	Neg	6.60	Neg	7	Não responde
139	24	Pos	+	-	+	+	Neg	7.00	Neg	7	Não
140	24	Pos	-	-	+	-	Neg	6.61	Neg	6	Não responde
141	29	Pos	+	-	+	+	Neg	4.56	Neg	6	Não
142	30	Pos	-	-	+	-	Neg	6.23	Neg	9	Não responde
143	31	Pos	+	-	+	-	Neg	9.84	Pos	16	Não responde
144	32	Pos	+	-	+	-	Neg	9.24	Ind	12	Sim
145	32	Pos	-	-	+	-	Neg	7.42	Ind	11	Sim
146	31	Pos	-	-	+	-	Neg	5.22	Neg	7	Não responde
147	32	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.2	Neg	0	Não

148	24	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.2	Neg	0	Não
149	22	Pos	+	-	+	-	Neg	5.84	Neg	9	Não responde
150	29	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.2	Neg	0	Não
151	38	Neg	-	-	-	-	Neg	<0.2	Neg	0	Não responde

Neg- Negativo, Equi- equívoco, Pos- positivo

+ Presença de banda, - ausência de banda

### Valores de Referência dos kits

	Negativo	Equívoco	Positivo
Liaison <sup>®</sup> Rubella IgG (DiaSorin)	<10	-	≥10
VIDAS <sup>®</sup> RUB IgG II (bioMérieux)	<10	10-14	≥15