



**Sofia Jardim Cardoso**

Licenciada em Química Aplicada – Ramo de Biotecnologia

**Desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos  
do tipo ELISA para pesquisa de *Legionella  
pneumophila* em suporte de papel utilizando a  
tecnologia *Lab-on-Paper***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT - UNL

Coorientador: Paulo Jorge Pereira Cruz Paixão, Prof. Doutor,  
NMC/FCM-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Cecília Afonso Roque

Arguente: Prof. Doutor José Ricardo Ramo Franco Tavares

Vogal: Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2016**



**Sofia Jardim Cardoso**

Licenciada em Química Aplicada – Ramo de Biotecnologia

**Desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos  
do tipo ELISA para pesquisa de *Legionella  
pneumophila* em suporte de papel utilizando a  
tecnologia *Lab-on-Paper***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT - UNL

Coorientador: Paulo Jorge Pereira Cruz Paixão, Prof. Doutor,  
NMS/FCM–UNL

**Março 2016**



**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS  
IMUNOENZIMÁTICOS DO TIPO ELISA PARA  
PESQUISA DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* EM  
SUPORTE DE PAPEL UTILIZANDO A TECNOLOGIA  
*LAB-ON-PAPER***

Copyright © 2016 – Todos os direitos reservados.

Sofia Jardim Cardoso

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## ELEMENTOS BIBLIOGRÁFICOS RESULTANTES DA DISSERTAÇÃO

Cardoso, S<sup>2</sup>; Chasqueira, MJ<sup>1</sup>; Marques, A<sup>1</sup>; Fortunato, E<sup>2</sup>; Paixão, P<sup>1</sup>; *Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático para a pesquisa de Legionella pneumophila em suporte de papel utilizando a tecnologia Lab-on-Paper*, 14 outubro de 2015, Porto.

<sup>1</sup>CEDOC, Centro de Estudos de Doenças Crónicas, NOVA *Medical School* / Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Campo dos Mártires da Pátria, 130, 1169-056 Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup>CENIMAT/I3N, Departamento de Ciência dos Materiais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Campus de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal.

*Poster* apresentado no 14<sup>o</sup> Encontro Nacional de atualização em infeciologia e publicado no livro de resumos 14-18 outubro de 2015, Centro de Congressos Porto Palácio, Avenida Boavista, Porto – Portugal.



Dedicado à ciência! Este trabalho é o meu contributo.

*"Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe por provar o contrário."*

*Albert Einstein*



## AGRADECIMENTOS

É com enorme satisfação e realização que termino esta grande etapa da minha formação acadêmica.

Este trabalho foi realizado com muita dedicação, esforço, determinação e com a consciência que dei o meu melhor mas não o tinha conseguido fazer sozinha. Por isso, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora, Professora Elvira Fortunato por me ter proporcionado a integração num centro de investigação de excelência e a oportunidade de trabalhar noutra faculdade muito prestigiada.

Ao meu coorientador, Professor Paulo Paixão pela orientação, conhecimentos transmitidos, capacidade de estímulo ao longo de todo o trabalho e por me ter dado a possibilidade de integrar num grupo de trabalho tão rico quer a nível profissional como pessoal.

Quero agradecer do fundo do coração à Augusta, à Lúcia e à Doutora Jú todo o conhecimento, experiência, conselhos, histórias, desabafos, todos os momentos divertidos e alegres que partilhamos, as vitórias que celebramos e os insucessos que ultrapassamos. Obrigada por me terem dado a conhecer o melhor exemplo de entreatajuda, companheirismo, partilha, boa disposição e bom ambiente no trabalho. Obrigado por terem sido incansáveis, por me terem recebido tão bem e por me terem proporcionado um ambiente tão familiar, foram quase como umas segundas mães para mim. Levo comigo todos os conselhos que me deram, quer a nível profissional como pessoal.

Aos colegas de laboratório pelas conversas, momentos de descontração, pela ajuda e companhia.

Ao Professor António Matos do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz pela disponibilidade em utilizar o seu microscópio eletrónico de varrimento, por todo o seu vasto conhecimento e experiência transmitido e por toda ajuda que prontamente ofereceu. No mesmo contexto à Daniela Gomes do CENIMAT pela ajuda e paciência na visualização das amostras no microscópio eletrónico de varrimento.

À Carolina Marques que sempre se disponibilizou para me ajudar em qualquer questão ou problema que tivesse e por todo o conhecimento que me transmitiu.

Se terminei esta etapa tão importante da minha vida com sucesso, grande parte devo aos meus pais por toda a educação, amor, conhecimento transmitido, ajuda, apoio incondicional e pelo esforço que fizeram para permitir que eu seguisse com estudos. Mas também não poderia deixar de agradecer ao resto da família, irmão, tios, primos, avós porque a família é o meu grande pilar e se hoje, sou o que sou a todos eles o devo.

À minha outra família, à família que eu escolhi, os meus amigos, obrigado ao grupo da "Motivação" e ao grupo dos "Fixes" por todos os momentos divertidos e de descontração, todas as conversas, gargalhadas, desabafos, alegrias, apoio, partilhas, obrigado pela vossa amizade e por simplesmente estarem lá nos momentos importantes e quando é preciso.

E porque o melhor guarda-se para o fim queria agradecer ao meu melhor amigo, confidente, companheiro, amante e namorado por todo o apoio, amor, conselhos, carinho, desabafos, paciência, ajuda, alegrias...por tudo mesmo!

Um grande obrigado a todos vocês por me terem feito terminar esta etapa com sucesso e da melhor maneira possível! O esforço, as noites mal dormidas, o *stress*, o cansaço, os insucessos, tudo valeu a pena!



## RESUMO

Atualmente, o diagnóstico da Doença dos Legionários é habitualmente efetuado através da pesquisa do antígeno na urina, por imunocromatografia e por ensaios imunoenzimáticos.

Dado os gastos crescentes que se verificam na área do diagnóstico laboratorial, existe a necessidade de desenhar testes de baixo custo e fiáveis, que permitam ser uma alternativa às atuais tecnologias de diagnóstico. Neste contexto surgiu o projeto *Lab-on-Paper*, que visa o desenvolvimento de testes de diagnóstico em papel, descartáveis, baratos, de simples e rápida utilização.

Com este trabalho pretende-se desenvolver um teste de diagnóstico rápido (*point-of-care*) baseado na tecnologia *Lab-on-Paper* para a deteção de *Legionella pneumophila* através de um ensaio imunoenzimático (ELISA).

O teste baseia-se na impressão de uma microplaca de ELISA em papel, realizando-se em seguida o procedimento idêntico a uma ELISA convencional. Este método não requiere equipamento sofisticado, efetuando-se a leitura de forma visual. Nos ensaios realizados, utilizaram-se suspensões de uma estirpe *Legionella pneumophila* serogrupo 1, adsorvidas nos poços do sensor de papel (filtro e fotocópia), anticorpo policlonal anti-*Legionella* conjugado com a enzima peroxidase de rábano (HRP) e o substrato ácido etilbenzotialino sulfónico (ABTS).

A técnica desenvolvida provou ser exequível para a deteção da bactéria *Legionella pneumophila* serogrupo 1 utilizando uma ELISA convencional e quando transposta para um sensor de papel de filtro revelou ter uma sensibilidade idêntica ( $10^6$  UFC/mL). No sensor de papel fotocópia constatou-se uma diminuição da sensibilidade de um log<sub>10</sub> ( $10^7$  UFC/mL).

A tecnologia *Lab-on-Paper* permitiu reduzir os custos diminuindo os volumes de imunoreagentes (para metade), de consumíveis (pontas de micropipetas descartáveis) e os equipamentos utilizados (leitor de microplacas). Esta metodologia pode ser realizada num laboratório com poucos recursos e como permite a substituição da microplaca poliestireno por papel (biodegradável) revela-se amiga do ambiente.

Esta alternativa é promissora para o diagnóstico rápido e pretende contribuir para a evolução dos testes *point-of-care*.

**PALAVRAS-CHAVE:** biossensores; sensores de papel; tecnologia *Lab-on-Paper*; teste de diagnóstico rápido; ensaio imunoenzimático (ELISA); *Legionella pneumophila*;



## ABSTRACT

Currently, the diagnosis of Legionnaires' disease is usually realized by searching the antigen in the urine. The immunoassays and immunochromatographic methods are commonly used.

Given the growing costs that occur in the field of laboratory diagnostics, there is a need to design low cost and reliable tests to be an alternative to the current diagnostic technology. In this context emerge the Lab-on-Paper technology which aims to develop diagnostic tests on paper, disposable, cheap, simple and quick to use.

The objective of this work is to develop point-of-care test based on the Lab-on-Paper technology for *Legionella pneumophila* detection via an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The test is based on the printing of an ELISA plate on paper, then carrying out the same procedure as a conventional ELISA. This method does not require sophisticated equipment, reading can be made visually. The tests is performed using suspensions of a *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain adsorbed to the wells of the paper sensor (filter and photocopy), anti-*Legionella* polyclonal antibody conjugated with the enzyme horseradish peroxidase (HRP) and the substrate etilbenzotialino sulfonic acid (ABTS).

The technique developed has proved practical for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 using a standard ELISA and into a filter paper sensor, both techniques have identical sensitivity ( $10^6$  CFU/mL). In photocopy paper sensor evidenced a decrease in the sensitivity of log<sub>10</sub> ( $10^7$  CFU/mL).

The Lab-on-Paper technology reduce diagnostic costs by decreasing the volume of immunoreagents (half), consumables (disposable pipettes tips) and equipment used (microplate reader). This methodology can be carried out in a laboratory with few resources and to allow the replacement of polystyrene plate by paper (biodegradable) proves to be environmentally friendly.

This alternative is promising for rapid diagnosis and aims to contribute to the development of point-of-care testing.

**KEYWORDS:** biosensors; paper-based sensors; Lab-on-Paper technology; point-of-care; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); *Legionella pneumophila*;



## LISTA DE ACRÓNIMOS

**Abs** – Absorvância

**ABTS** – Ácido etilbenzotialino sulfónico

**Ag** – Antigénio

**AKD** – Dímeros de alquil ceteno (do inglês, *Alkyl Ketene Dimer*)

**AP** – Fosfatase alcalina (do inglês, *Alkaline Phosphatase*)

**ASA** – Anidridos alquenil succínico (do inglês, *Alkyl Succinic Anhydride*)

**ASSURED** – Acessível, Sensível, Específico, Fácil utilização, Rápido e Robusto, não necessita de Equipamento e para ser entregue à aqueles que necessitam (do inglês *Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free and Delivered to those in need*).

**BCYE** – Solução de extrato de levedura, como fonte rica em nutrientes com carvão vegetal (do inglês *Buffered Charcoal Yeast Extract*)

**CEDOC** – Centro de Estudos de Doenças Crónicas

**CENIMAT** – Centro de Investigação em Materiais

**DAB** – Diaminobenzidina

**DL** – Doença dos Legionários (do inglês, *Legionnaires Disease*)

**ELISA** – Ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**HDMS** – Hexametildissilazano (do inglês, *Hexamethyldisilazane*)

**HRP** – Peroxidase de rábano (do inglês, *Horseradish Peroxidase*)

**IgG** – Imunoglobulina classe G

***L. pneumophila*** – *Legionella pneumophila*

**LPS** – Lipopolissacarídeo (do inglês *lipopolysaccharide*)

**NMS/FCM** – *Nova Medical School* / Faculdade de Ciências Médicas

**PBS** – Solução salina tamponada com fosfato (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

**POC** – Testes de diagnóstico rápido (do inglês *Point-Of-Care*)

**SEM** – Microscopia Eletrônica de Varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*)

**Sg** – Serogrupo

**T.A.** – Temperatura ambiente

**TMB** – Tetrametilbenzidina

**TWEEN 20** – Polissorbato 20

**UFC** – Unidade Formadora de Colônias

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

$\lambda$  – Comprimento de onda



## ÍNDICE DE MATERIAS

AGRADECIMENTOS .....	ix
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
LISTA DE ACRÓNIMOS .....	xv
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xvii
ÍNDICE DE MATERIAS.....	xix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xxiii
INDICE DE TABELAS.....	xxvii
<b>1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Biossensores .....	3
2.1.1. Biossensores em papel .....	4
2.1.1.1. Composição química do papel.....	4
2.1.1.2. Característica do papel .....	5
2.1.1.3. Caraterização dos diferentes tipos de papel.....	6
2.1.1.4. Vantagens do papel .....	7
2.1.1.5. Tecnologia <i>Lab-on-Paper</i> .....	8
2.2. Ensaio imunoenzimático – ELISA .....	9
2.2.1. Suporte .....	11
2.2.1.1. Suporte em papel .....	12
2.2.2. Imunoreagentes.....	13
2.3. <i>Legionella pneumophila</i> .....	15
2.3.1. Condições de crescimento em laboratório .....	15
2.3.2. Patogenicidade .....	16
2.3.2.1. Surtos .....	18
2.3.2.2. Diagnóstico (ELISA).....	19
2.3.2.3. Características antigénicas .....	20
2.4. Técnicas de caracterização.....	20
2.4.1. Espectrofotómetro de UV/Visível.....	20
2.4.2. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) .....	21

<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Construção do sensor de papel.....	23
3.2. Solução de antigénio .....	25
3.2.1. Técnica Drop-plate .....	25
3.3. Ensaio de ELISA.....	26
3.3.1. Ensaio de ELISA em microplaca poliestireno .....	27
3.3.2. Ensaio de ELISA em papel (papel fotocópia e papel de filtro).....	28
3.3.2.1. Processo de lavagem.....	28
3.3.2.2. Registo dos resultados.....	29
3.3.3. Otimização do ensaio de ELISA.....	29
3.3.4. Avaliação da especificidade .....	30
3.4. Caracterização por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).....	30
3.4.1. Protocolo para a preparação de amostras biológicas.....	31
3.4.1.1. Preparação das amostras biológicas em papel .....	32
<b>4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
4.1. Técnica Drop-plate .....	33
4.2. Otimização do ensaio de ELISA.....	34
4.2.1. Solução de revestimento .....	34
4.2.2. Solução de anticorpo .....	35
4.2.3. Solução de substrato.....	37
4.2.4. Protocolo otimizado em microplaca.....	39
4.3. Ensaio de ELISA em papel.....	39
4.3.1. Volume de imunoreagentes.....	39
4.3.2. Modo de impressão do sensor .....	40
4.3.3. Tampão de bloqueio .....	41
4.3.4. Protocolo otimizado em papel (papel fotocópia e papel de filtro) .....	42
4.4. Estudo da sensibilidade analítica .....	42
4.5. Avaliação da especificidade .....	43
4.6. Caracterização por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).....	45
4.6.1. Suspensão de <i>L. pneumophila</i> .....	45
4.6.2. Sensor de papel revestido com <i>L. pneumophila</i> .....	46

4.7. Análise de custos do suporte de papel desenvolvido .....	47
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>49</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
ANEXOS.....	55
A – Protocolo do meio BCYE – $\alpha$ (Buffered Charcoal Yeast Extract) .....	55



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Estrutura molecular da Celulose. ....	5
<b>Figura 2.2:</b> Esquema das etapas envolvidas no fabrico dos dispositivos: <b>(ii)</b> impressão; <b>(iii)</b> difusão da cera; <b>(v)</b> encapsulamento. ....	8
<b>Figura 2.3:</b> Esquema dos três tipos de ELISA: direta, indireta e sanduíche. ....	9
<b>Figura 2.4:</b> Esquema do procedimento de sensibilização do suporte. ....	10
<b>Figura 2.5:</b> Esquema do procedimento de bloqueio do suporte. ....	10
<b>Figura 2.6:</b> Esquema do procedimento da adição do conjugado enzimático. ....	10
<b>Figura 2.7:</b> Esquema do procedimento da adição da solução reveladora. ....	10
<b>Figura 2.8:</b> Microplaca transparente de poliestireno com 96 poços ....	12
<b>Figura 2.9:</b> Representação esquemática dos anticorpos e antígenos do ensaio de ELISA em papel para a deteção de anticorpos para o HIV - 1 gp41. ....	12
<b>Figura 2.10:</b> Esquema do anticorpo com a enzima HRP num ensaio de ELISA direto. ....	15
<b>Figura 2.11:</b> Imagem de Legionella em placa no meio BCYE. Tempo de incubação de 5 dias a 37°C. Observação à lupa com ampliação de 40x. ....	16
<b>Figura 2.12:</b> Barra cronológica dos surtos de Doença dos Legionários registados mundialmente e respetivos números de casos e óbitos. ....	18
<b>Figura 2.13:</b> Número de casos de doenças dos Legionários notificados. <b>(A)</b> na Europa em 2013; <b>(B)</b> em Portugal de 2004 a 2013. ....	19
<b>Figura 2.14:</b> Estrutura do lipopolissacarídeo (LPS). ....	20
<b>Figura 2.15:</b> Representação esquemática de um equipamento de SEM. ....	22
<b>Figura 3.1:</b> Protótipo do sensor de papel <b>(A)</b> Primeiro design; <b>(B)</b> Design alterado.. ....	23
<b>Figura 3.2:</b> Material utilizado para a impressão da cera. <b>(A)</b> impressora de cera sólida Xerox ColorQube 8570; <b>(B)</b> tinteiros de cera sólida Xerox. ....	24
<b>Figura 3.3:</b> Processo de difusão da cera ....	24
<b>Figura 3.4:</b> Espectrofotómetro de UV/Visível utilizado, equipamento existente na Nova Medical School, FCM-UNL. ....	25

<b>Figura 3.5:</b> Esquema ilustrativo da técnica drop-plate. ....	25
<b>Figura 3.6:</b> Esquema ilustrativo do procedimento do ensaio de ELISA em microplaca. ....	27
<b>Figura 3.7:</b> Leitor de microplacas Bio-Rad iMark™ utilizado, equipamento existente no CEDOC. ....	27
<b>Figura 3.8:</b> Sensor de papel pronto para ser utilizado no ensaio. ....	28
<b>Figura 3.9:</b> Esquema ilustrativo do procedimento do ensaio ELISA em papel. ....	28
<b>Figura 3.10:</b> Representação do processo de lavagem em papel <b>Erro! Marcador não definido</b> . ....	29
<b>Figura 3.11:</b> Quimidoc utilizado para o registo dos resultados em papel, equipamento existente no CEDOC. ....	29
<b>Figura 3.12:</b> Equipamento utilizado na Microscopia eletrónica de varrimento existente no CENIMAT/I3N. ....	31
<b>Figura 4.1:</b> Suspensões de bactérias inoculadas através da técnica Drop-plate e incubada durante 24h a 37°C. <b>(i)</b> Suspensão de <i>L. pneumophila</i> ; <b>(ii)</b> Suspensão de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	33
<b>Figura 4.2:</b> Leitura de absorvância a 415 nm de dois ensaios utilizando tampões de revestimento diferentes com concentração crescente de Ag. ....	34
<b>Figura 4.3:</b> Leitura de absorvância a 415 nm de dois ensaios utilizando dois protocolos de revestimento diferentes com concentrações crescentes de Ag. ....	35
<b>Figura 4.4:</b> Leitura de absorvância a 415 nm para os diferentes tempos e temperaturas de incubação da solução de anticorpo com concentrações crescentes de Ag. ....	35
<b>Figura 4.5:</b> Leitura de absorvância a 415 nm de duas concentrações de anticorpo com concentrações crescentes de Ag. ....	37
<b>Figura 4.6:</b> Leitura de absorvância a 415 nm para diferentes tempos de incubação da solução de substrato com concentrações crescentes de Ag. ....	37
<b>Figura 4.7:</b> Leitura de absorvância a 415 nm para diferentes tempos de incubação da solução de substrato com concentrações crescentes de Ag. ....	38
<b>Figura 4.8:</b> Leitura de absorvância a 415 nm para diferentes tempos de incubação da solução de substrato com concentrações crescentes de Ag. ....	38
<b>Figura 4.9:</b> Ensaio de ELISA realizados em papel de filtro utilizando os volumes do ensaio de ELISA em microplaca. ....	39

<b>Figura 4.10:</b> Ensaios de ELISA realizados <b>(A)</b> no papel de filtro; <b>(B)</b> no papel de fotocópia. ....	40
<b>Figura 4.11:</b> Sensor de papel de fotocópia danificado pela utilização da micropipeta para retirar o líquido das diferentes soluções. ....	40
<b>Figura 4.12:</b> Sensor de papel após a difusão da cera. <b>(A)</b> Impressão do design em modo Enhancer; <b>(B)</b> Impressão do design em modo Photo. ....	41
<b>Figura 4.13:</b> Ensaios de ELISA no papel de fotocópia utilizando as concentrações de bloqueio de 5, 10, 20 e 30% de Molico. ....	41
<b>Figura 4.14:</b> Estudo da sensibilidade <b>(i)</b> em suporte de papel de filtro; <b>(ii)</b> em papel de fotocópia. ....	43
<b>Figura 4.15:</b> Exemplo de uma avaliação da especificidade realizado com o sensor de papel fotocópia. ....	44
<b>Figura 4.16:</b> Leitura de absorvância a 415 nm de três ensaios utilizando o revestimento com diferentes suspensões bacterianas e com concentrações crescentes de Ag. A seta vermelha indica a sensibilidade do ensaio. ....	45
<b>Figura 4.17:</b> Bactéria <i>L. pneumophila</i> observada no SEM, com ampliação 10.000x (esquerda) e ampliação 50.000x (direita). ....	45
<b>Figura 4.18</b> Bactéria <i>L. pneumophila</i> observada no SEM utilizando o protocolo otimizado. <b>(A)</b> suspensão, com ampliação 5.000x. <b>(B)</b> dimensões da bactéria, com ampliação 20.000x. ....	46
<b>Figura 4.19:</b> Sensor de papel revestido com <i>L. pneumophila</i> observado no SEM <b>(A)</b> papel de filtro, com ampliação de 5.000x <b>(B)</b> papel de fotocópia, com ampliação 10.000x. ....	46
<b>Figura 4.20:</b> Sensor de papel de filtro revestido com <i>L. pneumophila</i> , observação no SEM com ampliação 5.000x (direita e meio) e ampliação 10.000x (esquerda). ....	47
<b>Figura 4.21:</b> Sensor de papel de fotocópia revestido com <i>L. pneumophila</i> , observação no SEM, com ampliação 10.000x. ....	47



## INDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Constituição de uma folha de papel, discriminação dos aditivos utilizados e respetiva função. ....	6
<b>Tabela 2.2:</b> Propriedades macroscópicas dos papéis testados. Adaptado de Jacob, et al <sup>[12]</sup> . ....	7
<b>Tabela 2.3:</b> Sensores desenvolvidos com a tecnologia Lab-on-Paper. ....	13
<b>Tabela 3.1:</b> Bactérias responsáveis por pneumonia no Homem utilizadas na avaliação da especificidade. ....	30
<b>Tabela 3.2:</b> Bactérias responsáveis por infeção urinária no Homem utilizadas na avaliação da especificidade. ....	30
<b>Tabela 4.1:</b> Leitura de absorvância a 415 nm das diferentes concentrações de anticorpo testadas com Ag a 10 <sup>9</sup> UFC/ml. ....	36
<b>Tabela 4.2:</b> Condições otimizadas das variáveis testadas. ....	39
<b>Tabela 4.3:</b> Condições otimizadas das variáveis testadas. ....	42
<b>Tabela 4.4:</b> Resultado da avaliação da especificidade realizada com as bactérias responsáveis por pneumonia no Homem. ....	43
<b>Tabela 4.5:</b> Resultado da avaliação da especificidade realizada com as bactérias responsáveis por infeção urinária no Homem. ....	44
<b>Tabela 4.6:</b> Análise de custos do suporte de papel de fotocópia. ....	48
<b>Tabela 4.7:</b> Análise de custos do suporte de papel de filtro. ....	48



## Capítulo 1

### 1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVO

O papel tem emergido nos últimos anos como um material de suporte para testes biológicos e químicos oferecendo inúmeras vantagens, tais como, baixo custo, fácil manuseamento, descartabilidade e biocompatibilidade. O papel pode ser usado facilmente em situações *point-of-care* providenciando métodos de rastreio em regiões com reduzido acesso a infraestruturas médicas e hospitalares.

A utilização dos testes de POC têm vindo a aumentar nomeadamente na deteção de substâncias bioquímicas, como é o caso da glucose, e recentemente na deteção de microrganismos patogénicos para o Homem.

A bactéria *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) é um exemplo de um microrganismo patogénico, esta bactéria encontra-se disseminada nos ambientes aquáticos e quando é inalada por indivíduos suscetíveis pode provocar uma pneumonia severa, a Doença dos Legionários (DL). A DL por vezes ocorre em surtos epidémicos, podendo atingir várias pessoas, como no recente surto em Portugal, em Novembro de 2014, onde 449 pessoas foram afetadas e 12 faleceram. Neste como em outros casos de surto, o fluxo de doentes que acorre aos serviços de saúde é grande. No entanto, dada a particularidade de esta bactéria só ser sensível a determinados agentes antimicrobianos, a administração correta da terapêutica é essencial para um melhor prognóstico da doença. Assim, a utilização de testes de diagnóstico simples e rápidos é crucial para iniciar precocemente a terapêutica, diminuindo a perda de vidas humanas.

Para o diagnóstico da DL já existem ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e imunocromatográficos que detetam a presença do antigénio (Ag) na urina permitindo um diagnóstico rápido, isto é, no próprio dia quando comparado com a cultura, método de referência para o diagnóstico da DL, mas que pode demorar até 10 dias. Existe assim, uma necessidade crescente de produzir testes de diagnóstico, rápidos, fáceis e económicos e é neste contexto que surge a tecnologia *Lab-on-Paper*.

O principal objetivo deste trabalho é produzir um teste de *point-of-care* de fácil utilização, rápido, económico e amigo do ambiente (biodegradável). Neste teste será utilizado como suporte o papel recorrendo a tecnologia *Lab-on-Paper* (ELISA em formato papel) como alternativa às microplacas convencionais moldadas a partir de polímeros, material prejudicial para o ambiente.

No presente trabalho descreve-se o desenvolvimento de um teste de ELISA para a *L. pneumophila*:

1. Testar um ensaio ELISA em microplacas de microtitulação convencionais – definir os reagentes a utilizar, testar a exequibilidade;
2. Otimizar o protocolo do ensaio de ELISA em microplaca de poliestireno – solução de revestimento, tempo e temperatura da solução de revestimento, da solução de anticorpo e do substrato, concentração da solução de anticorpo;

3. Produção de um ensaio ELISA em suporte de papel - otimização do modo de impressão do sensor de papel, do volume e da concentração dos reagentes (tampão de bloqueio e anticorpo conjugado com enzima);
4. Avaliar a especificidade do ensaio – utilização de outras bactérias causadoras de pneumonia e infeção urinária;
5. Estudar a sensibilidade analítica do ensaio utilizando uma bactéria *L. pneumophila* do sg1;
6. Testar o ensaio em suporte de papel com diferente serogrupos de *L. pneumophila* – sg 4 e 6;
7. Caracterização da bactéria *L. pneumophila* do sg1 em suspensão e no suporte de papel após a adsorção, utilizando microscopia eletrónica de varrimento (SEM);

Este trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento de testes de *point-of-care* para a deteção de *L. pneumophila* em diferentes contextos: hospitalar, ambiental e industrial (sistemas de refrigeração).

Um objetivo secundário deste trabalho prende-se com a evolução desta metodologia, a fim de poder ser aplicada a outros microrganismos patogénicos para o Homem. Sendo estes testes mais baratos, rápidos, de fácil utilização e que não exigem equipamento especializado, o seu desenvolvimento é uma mais-valia na deteção de doenças em regiões subdesenvolvidas.

## Capítulo 2

### 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este capítulo descreve os fundamentos teóricos necessários para a compreensão do trabalho desenvolvido: otimização de um sensor de papel para o diagnóstico da Doença dos Legionários. Deste modo, são abordadas três grandes áreas: os biossensores, os ensaios de ELISA e a Doença dos Legionários. Na área dos biossensores destaca-se os biossensores em papel, descreve-se a composição química do papel, as propriedades de interesse para o presente trabalho e a tecnologia associada ao desenvolvimento do sensor. Na área dos ensaios de ELISA descreve-se o princípio do ensaio e os estudos desenvolvidos até ao presente utilizado a metodologia da ELISA em papel. Em seguida, descreve-se a bactéria *L. pneumophila* e a patologia a ela associada. Para finalizar este capítulo é realizada uma revisão dos princípios das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho (espectrofotómetro de UV/visível e microscopia eletrónica de varrimento).

#### 2.1. Biossensores

De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry*, um biossensor é "um dispositivo integrado que é capaz de fornecer informação quantitativa ou semi-quantitativa específica usando um elemento de reconhecimento biológico (recetor bioquímico) que é mantido em contacto direto com um elemento de transdução" <sup>[1]</sup>.

Um biossensor é assim um pequeno dispositivo analítico que combina uma componente biológica com um transdutor físico-químico para deteção de um analito que pode ser biológico, como por exemplo, vírus, bactérias, fungos ou mesmo células cancerígenas <sup>[2]</sup>.

As suas aplicações são diversas, desde a área clínica (médica ou veterinária), ambiental ou de bioprocessos, sendo que o seu principal foco é o desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido, *point-of-care* (POC). As áreas de aplicação dos testes POC são muito variadas, desde a agricultura, saúde animal, ciência forense, segurança alimentar, diagnóstico médico, entre outras <sup>[3]</sup>.

Os testes POC tornaram-se relativamente comuns nos países desenvolvidos, como o caso do teste rápido da gravidez. Mas podem também ser utilizados para deteção e diagnóstico precoce de doenças, aumentando assim a hipótese de sobrevivência do paciente, além de reduzir os custos envolvidos no diagnóstico e na ministração de tratamentos mais agressivos devido ao avançar da doença.

Os testes POC são igualmente importantes nas regiões subdesenvolvidas pois proporcionam meios de rastreio em regiões com difícil ou escasso acesso a infraestruturas médicas e hospitalares, diminuindo o número de deslocações aos serviços clínicos especializados e, conseqüentemente, as despesas médicas <sup>[4]</sup>.

O diagnóstico molecular atualmente usado, apesar da sua eficiência, é dispendioso, requerendo equipamento e pessoal especializados, dificultando a sua utilização em várias zonas do planeta.

Os biossensores surgem, então, como uma alternativa portátil, mais económica, de simples manuseamento, e muitas vezes apresentam algumas das características do diagnóstico molecular.

No entanto, apesar dos avanços em pesquisa e desenvolvimento, ainda existem limitações que impedem a aplicação dos biossensores no setor da saúde. Para difundir a utilização dessa tecnologia, é necessário o desenvolvimento de sistemas mais eficientes, confiáveis e de fácil utilização.

### **2.1.1. Biossensores em papel**

O papel é um bom meio para testes colorimétricos porque fornece um contraste forte devido à sua opacidade e à cor branca. Além disso, o papel é inflamável, facilitando a eliminação dos testes por incineração <sup>[5]</sup>.

Sabe-se que sistemas analíticos baseados em papel são adequados para a aplicação ao diagnóstico. Uma abordagem interessante combina o uso de plataformas baseadas em papel barato e análise digital de imagens para identificação de analitos relevantes. Este conceito faz uso de correlações colorimétricas quantitativas através de fotografia para digitalizar resultados, permitindo a medição da intensidade da cor <sup>[6]</sup>.

Por definição, o papel é um material fino, leve e flexível, constituído por redes de fibras de celulose naturais entrelaçadas numa rede compacta, feito a partir de uma pasta aquosa que posteriormente é seca <sup>[5]</sup>.

A sua invenção remonta a 105 d.C. e é atribuída a Ts'ai Lun, ministro da agricultura do imperador Chinês Ho Ti's. Ts'ai Lun aperfeiçoou um processo de fabrico de papel a partir de cascas, pedaços de bambu, redes de pesca e algodão, produzindo papel de alta qualidade.

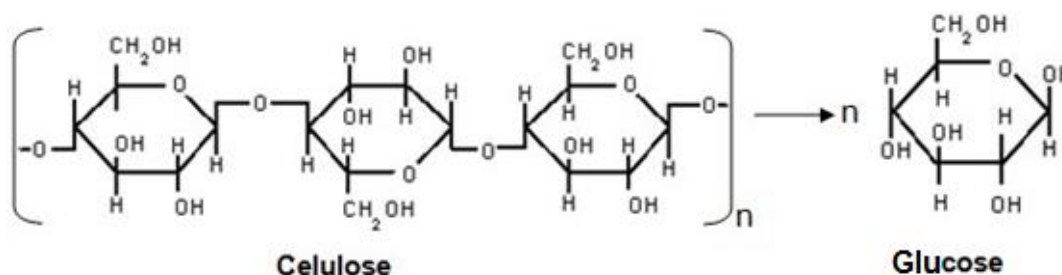
O papel é uma parte essencial da civilização há mais de 200 anos e tende a ser encarado com um material simples. No entanto, este material tem origem vegetal, pelo que apresenta grande complexidade a nível morfológico, físico e químico. O próprio processo de produção é altamente sofisticado, envolvendo engenharia e tecnologia de vanguarda <sup>[7]</sup>.

Sendo um material bastante versátil é utilizado em inúmeras aplicações, como por exemplo, na escrita e impressão, em embalagens, em utilitários (lenços de papel, papel higiénico, etc.), como meio de informação, entre outros. Recentemente tem emergido como suporte para sensores biológicos na deteção de vários analitos como a glucose, proteínas, biomarcadores e sequências de ADN <sup>[8]</sup>.

#### **2.1.1.1. Composição química do papel**

O hidrato de carbono mais abundante na composição do papel é a celulose, pelo que as propriedades físicas e mecânicas da folha de papel se devem às fibras celulósicas.

A celulose de origem natural é um polissacarídeo linear homogéneo composto por monómeros de glucose ligados linearmente e covalentemente por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, como representado na **figura 2.1** <sup>[8]</sup>.



**Figura 2.1:** Estrutura molecular da Celulose.

Este polissacarídeo encontra-se presente na parede celular, assumindo funções estruturais importantes. Quimicamente, a forte interação existente entre as moléculas de celulose é devido às ligações por pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo dos monómeros de glucose que originam a formação das fibras. Esta interação entre as fibras de celulose que constituem o papel concedem a resistência necessária à sua formação <sup>[8]</sup>.

A celulose existente na pasta de papel tem normalmente cadeias compostas por 300 a 1700 unidades de glucose.

Outros dois componentes principais do papel são a hemicelulose e a lenhina, que ajudam a manter as fibras de celulose juntas. A hemicelulose é um heteropolímero, formado por pentoses e hexoses, que, ao contrário da celulose, tem uma estrutura amorfa com ligações fracas entre os seus monómeros. A lenhina é um polímero aromático hidrofóbico com uma estrutura extremamente complexa. No processo de fabrico do papel esta é normalmente removida, visto que é fotossensível conferindo ao papel fragilidade e uma cor amarelada, como por exemplo o papel do jornal. Pelo contrário, a hemicelulose é benéfica para as propriedades do papel por lhe conferir resistência à tração <sup>[9]</sup>.

#### 2.1.1.2. Característica do papel

O papel é um material fino e flexível, constituído maioritariamente por uma rede de fibras de celulose que se mantêm unidas fisicamente pelo entrelaçamento das mesmas e, quimicamente por pontes de hidrogénio. As fibras de celulose têm forma de tubos cilíndricos com diâmetro médio de 20  $\mu\text{m}$  e, devido ao processo de fabrico encontram-se orientadas maioritariamente no eixo horizontal. A deposição de fibras de celulose cria uma rede com espaços vazios superficiais e interiores <sup>[10]</sup>.

As fibras celulósicas quimicamente são hidrofílicas, o que faz com que em contacto com água esta se espalhe na superfície e penetre nos poros da estrutura fibrosa do papel. Este processo causa um enorme problema pois grande maioria dos fins a que se destina o papel torna necessário que este seja resistente a líquidos polares. De forma a controlar este processo é necessário conferir ao papel uma maior resistência e carácter hidrofóbico e tal é conseguido com a introdução de aditivos químicos aquando da produção do papel. A elevada energia de interação, devido à facilidade com que a água forma ligações de hidrogénio com os grupos hidroxilo da celulose, faz com que o ângulo de contacto entre a superfície do papel e a água seja inferior a  $90^\circ$  e desta forma ocorra a penetração da água. O aumento do ângulo de

contacto entre a superfície do papel e a água é conseguido através dos agentes de colagem interna que cria uma barreira à penetração da substância aquosa. Os agentes de colagem interna mais utilizados são as colas resínicas, dímeros de alquil ceteno (AKD) e anidridos alquenil succínicos (ASA) que permite a utilização de carbonato de cálcio, que irá conferir um maior brilho e opacidade ao produto final. No entanto também existem desvantagens da colagem interna neutra/alcalina, como seja a possibilidade de ocorrer reações de hidrólise ou *milking* (desprendimento das partículas de carbonato de cálcio do papel) <sup>[11]</sup>.

Os constituintes de uma folha de papel e respetivas funções e quantidade estão representados na **tabela 2.1**.

**Tabela 2.1:** Constituição de uma folha de papel, discriminação dos aditivos utilizados e respetiva função. Adaptado de Marques <sup>[12]</sup>.

Constituinte		Quantidade (%)	Função
Fibras de celulose		~ 70	Principal constituinte
Carbonato de cálcio (CaCO <sub>3</sub> )		~ 20	Controla as características óticas
Aditivos na massa	Amido catiónico de batata	~ 10	Controla a resistência interna
	OBA ( <i>Optical Brightener Agent</i> )		Agente branqueador
	ASA ( <i>Alkyl Succinic Anhydride</i> )		Controla a penetração de líquidos
	Corantes (azul e violeta)		Controla a tonalidade
Aditivos na superfície	Amido de milho		Controla a resistência superficial
	OBA ( <i>Optical Brightner Agent</i> )		Agente branqueador
	AKD ( <i>Alkyl Ketene Dimer</i> )		Controla a penetração de líquidos
	Sal (NaCl)		Controla as características elétricas

O papel tem um longo registo de uso em laboratórios de bioquímica, como suporte para filtração e cromatografia. A química superficial do papel interfere na imobilização de biomoléculas podendo criar interações não específicas em ensaios colorimétricos e enzimáticos <sup>[13]</sup>.

A porosidade, juntamente com a química de superfície interferem no ângulo de contacto enquanto as propriedades óticas podem influenciar a revelação de resultados colorimétricos <sup>[13]</sup>.

Na perspetiva do presente trabalho, que usa o papel como suporte para reações de reconhecimento de microrganismos, as propriedades deste material (química superficial, porosidade, propriedades óticas, etc.) são de extrema importância.

### 2.1.1.3. Caracterização dos diferentes tipos de papel

O papel de filtro Whatman nº 1 apresenta um considerável número de registos em aplicações de microfluídica e biossensores em papel <sup>[14]</sup>. No entanto, devido ao seu custo elevado face a outros tipos de papel, têm sido desenvolvidos estudos com outros tipos de papéis mais económicos, como o caso do papel fotocópia.

No presente trabalho irá utilizar-se dois tipos de papel (Whatman nº 1, papel de fotocópia). Deste modo foram analisados e caracterizados na **tabela 2.2** o papel de filtro Whatman nº1, Whatman™ Papers (papel **W**) e o papel de impressão branco, cópia 2000® (papel **B**);

**Tabela 2.2:** Propriedades macroscópicas dos papéis testados. Adaptado de Jacob <sup>[15]</sup>.

Papel	Gramagem (g/m <sup>2</sup> )	Espessura (µm)	Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	Porosidade (%)	Custo (€/m <sup>2</sup> )
W	88	180	489	68,2	5,99
B	80	104	769	49	0,13

A gramagem (massa de papel seco por metro quadrado) e a espessura são duas propriedades macroscópicas regularmente usadas para caracterizar este tipo de material. Dividindo a gramagem do papel pela espessura obtemos a sua densidade. A porosidade do papel também está relacionada com estas propriedades pois resulta de espaços entre as fibras, lúmens de fibras não colapsados e porosidade intrínseca das fibras. Deste modo quanto maior a densidade de um determinado papel menos espaços existem entre as suas fibras e menor é a sua porosidade. Por outro lado a densidade e espessura do papel afetam as suas propriedades óticas como opacidade e brilho, que se revelam cruciais na revelação de ensaios colorimétricos realizados em papel.

O ângulo de contacto permite medir a afinidade dos substratos para materiais líquidos e através de um estudo realizado por Jorge Jacob em 2013 concluíram que o papel W é hidrófilo, apresentando valores de ângulo de contacto de 12°, o que se traduz numa elevada capacidade de absorção <sup>[15]</sup>.

O papel B revela um comportamento hidrofóbico com ângulos de contacto de 97,7°. As fibras de celulose apresentam uma forma cilíndrica achatada e aparenta maior densidade de fibras que o papel W <sup>[15]</sup>.

As diferenças nos ângulos de contacto do papel Whatman e do papel de fotocópia, que se refletem em diferenças nas propriedades superficiais entre ambos os papéis devem-se ao facto de durante o processo de fabrico do papel serem utilizados diferentes aditivos consoante a finalidade do papel. O papel de fotocópia possui na sua composição aditivos adicionais (especialmente o CaCO<sub>3</sub>), enquanto o papel Whatman é constituído quase unicamente pelas fibras de celulose <sup>[15]</sup>.

#### 2.1.1.4. Vantagens do papel

O papel é, inequivocamente, um material orgânico muito barato, fácil de manipular e padronizar e é compatível com a grande maioria das aplicações químicas, bioquímicas e médicas. Para além disso, a rede fibrosa que o constitui permite o transporte de líquidos através de forças capilares e por isso, a condução dos fluídos é realizada pela rede de fibras do papel. Esta rede de fibras dispersas aleatoriamente gera espaços livres que se comportam como tubos capilares. Através da pressão capilar, os líquidos são conduzidos sem necessidade de aplicar uma força externa <sup>[16]</sup>. O manuseamento de líquidos no papel é conseguido pela construção de canais hidrófilos de papel, onde os líquidos são conduzidos por ação capilar, delimitados por regiões onde as propriedades do papel são alteradas de modo a impedirem a

propagação do fluxo. O projeto *Lab-on-Paper* explora a utilização do papel em dispositivos de diagnóstico de elevado valor acrescentado, combinando as vantagens da microfluídica com as propriedades óticas do papel. A opacidade e a cor branca do papel fornecem o contraste ideal para uma revelação colorimétrica dos resultados. Além disso, o papel é inflamável, por isso os testes de diagnóstico podem ser eliminados facilmente e com segurança, por incineração, após a sua utilização <sup>[17]</sup>.

O papel, devido principalmente ao seu baixo custo, à sua simplicidade de uso e ao facto de ser descartável pode ser usado facilmente em situações POC em países subdesenvolvidos. Para além disso, tem a vantagem de necessitar pouco volume de amostra e reagentes, de execução rápida e fácil de transportar. Estas características juntamente com a independência de equipamentos complexos ou dispendiosos é um dos objetivos enfatizados pela Organização Mundial de Saúde para ter em conta no desenvolvimento de métodos de diagnóstico <sup>[53]</sup>.

Neste contexto o desenvolvimento da tecnologia *Lab-on-Paper* revela-se de extrema importância.

#### 2.1.1.5. Tecnologia *Lab-on-Paper*

O projeto *Lab-on-Paper* explora a utilização do papel em dispositivos de diagnóstico que combina vantagens como a redução do consumo de reagentes e de amostras biológicas, simplicidade de obtenção de resultados, facilidade de produção dos dispositivos em grande escala, com as propriedades óticas do papel.

Neste tipo de projeto é fundamental evitar a contaminação entre amostras adjacentes, pelo que é importante criar barreiras hidrofóbicas capazes de delimitar zonas hidrofílicas, zonas onde a reação ocorre. O método de impressão a cera, descrito pela primeira vez em 2009 por Carrilho, Martinez, & Whitesides, é um método simples e eficaz para criar este tipo de barreira <sup>[18]</sup>.

Esta técnica envolve cinco fases distintas (**figura 2.2**):

- (i) Desenho dos padrões de cera hidrofóbicos em programa informático;
- (ii) Impressão a cera dos padrões desenhados;
- (iii) Aquecimento para difusão dos padrões de cera por toda a espessura do papel;
- (iv) Deposição dos reagentes;
- (v) Impressão do encapsulamento.

**Figura 2.2:** Esquema das etapas envolvidas no fabrico dos dispositivos: (ii) impressão; (iii) difusão da cera; (v) encapsulamento. Adaptado de Costa <sup>[19]</sup>.

Para a obtenção das microplacas em papel, utiliza-se uma impressora que aplica calor à cera e causa a sua fusão, permitindo criar os padrões que são depois transferidos para a superfície do papel. Geralmente utiliza-se uma placa térmica para fornecer o calor necessário à difusão da cera na superfície por toda a espessura do papel.

As zonas hidrofílicas geradas desta forma têm a sua altura definida pela espessura do papel e largura igual à distância entre as barreiras de cera que os delimitam <sup>[19]</sup>.

Em seguida procede-se à deposição dos reagentes necessários ao desenvolvimento das reações colorimétricas específicas e, após a secagem dos mesmos, realiza-se a impressão de outra camada de cera de forma a encapsular e assim proteger o sensor <sup>[19]</sup>.

Os resultados colorimétricos podem ser analisados visualmente, tal como os testes rápido de gravidez, ou através de uma digitalização ou fotografia que permite analisar, no local, os dados com um programa informático simples ou envia-los para laboratórios centralizados mais bem equipados.

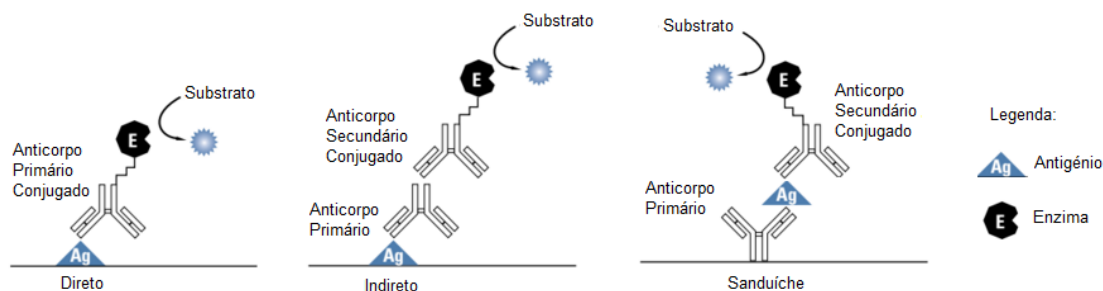
## 2.2. Ensaio imunoenzimático – ELISA

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) é uma técnica usada para detetar numa amostra a presença de anticorpo ou um Ag através da interação antígeno-anticorpo.

Esta técnica surgiu em 1971, quando dois grupos de pesquisadores, um grupo holandês formado por Van Weemen e Schurs e um grupo sueco por Engvall e Perlmann, idealizaram e introduziram pioneiramente, o método imunoenzimático para deteção e quantificação de antígenos ou anticorpos específicos. Para além disso, observaram, simultaneamente, que as proteínas poderiam ser imobilizadas numa superfície sólida de poliestireno e que a reação anticorpo-antígeno poderia ser revelada pela formação de produtos coloridos formados da reação enzima-substrato, na presença de um componente dador de elétrões denominado cromógeno <sup>[20], [21]</sup>.

A ELISA foi intensamente difundida a partir de 1974 através de publicações referentes às doenças infetocontagiosas.

Atualmente, existe 3 tipos de teste de ELISA: direta, indireta e sanduíche (**figura 2.3**).



**Figura 2.3:** Esquema dos três tipos de ELISA: direta, indireta e sanduíche. Adaptado de [22].

O método que se vai utilizar neste trabalho é o ensaio direto que compreende as seguintes etapas <sup>[23]</sup>:

### A - Sensibilização do suporte

Normalmente é usada uma microplaca de superfície inerte com poços onde são depositados e adsorvidos os antígenos. Estes encontram-se em suspensão numa solução de revestimento que auxilia a sua adesão ao suporte, a este processo dá-se o nome de sensibilização. Assim, para sensibilizar a microplaca trata-se os imunorreagentes com uma solução alcalina, que lhes confere carga efetiva negativa, promovendo a adsorção passiva à

microplaca por interações eletrostáticas (forças coulombianas), em virtude do poliestireno ou polivinil utilizado para confeccionar as microplacas ter cargas positivas.

De seguida é realizada uma lavagem com um detergente não iónico (Tween 20 é o mais usual) que retira o excesso de Ag que não se ligou.



**Figura 2.4:** Esquema do procedimento de sensibilização do suporte.

### B - Bloqueio

O revestimento da superfície interna da microplaca de ELISA, por exemplo, com o antígeno, não é completo ficando algumas regiões livres. Estes espaços devem ser ocupados com qualquer molécula alheia ao sistema reacional, no sentido de reduzir ou mesmo evitar a ligação inespecífica de componentes da amostra, geradores de reações indesejáveis que possibilitam falsas interpretações (reações inespecíficas). Normalmente as moléculas utilizadas para este fim são proteínas, como por exemplo tampões de soro de cabra, de Molico ou de BSA e a cobertura destes espaços vazios é chamada de bloqueio. Novamente, no final é feita a lavagem para retirar o excesso de tampão de bloqueio que não ligou.

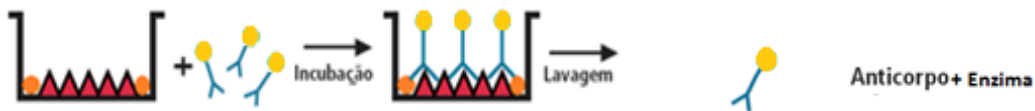


**Figura 2.5:** Esquema do procedimento de bloqueio do suporte.

### C - Conjugado enzimático

A superfície é então tratada com uma solução de anticorpo acoplada com uma enzima (conjugado). As enzimas mais usadas são a fosfatase alcalina e a peroxidase.

A superfície é lavada novamente para retirar os anticorpos que não se ligaram ao Ag.



**Figura 2.6:** Esquema do procedimento da adição do conjugado enzimático.

### D - Solução reveladora

A solução reveladora consiste num tampão que contém o substrato correspondente à enzima conjugada e um componente dador de eletrões que se dá o nome de cromogéneo. O que acontece é que a enzima conjugada quebra o substrato e, seus produtos atuam no cromogéneo, alterando a coloração do sistema.



**Figura 2.7:** Esquema do procedimento da adição da solução reveladora.

### E - Leitura dos resultados

A leitura pode ser feita:

- De forma visual: simplesmente pela observação da alteração da coloração;
- No espectrofotómetro: com um espectrofotómetro apropriado para leitura de microplacas de ELISA é realizada a leitura da absorvância da suspensão, que é proporcional à intensidade de cor desenvolvida após adição do cromogéneo.

Absorvância é a capacidade intrínseca que um meio tem para absorver radiações emitidas a uma frequência ou comprimento de onda ( $\lambda$ ) específicos.

Quanto maior a absorvância lida, maior será a concentração de enzima conjugada e, conseqüentemente, maior será a concentração da substância pesquisada. Logo, a intensidade do sinal do produto desta reação é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra.

Os espectrofotómetros e/ou espectrofluorímetros são instrumentos amplamente utilizado em laboratórios para analisar resultados de ensaios realizados em microplacas e são instrumentos extensivamente validados para uma vasta gama de aplicações em laboratórios e clínicas. <sup>[24]</sup>.

#### 2.2.1. Suporte

Na técnica ELISA, parte das reações ocorrem em meio sólido de maneira a separar os imunocomplexos dos reagentes não ligados.

O meio sólido utilizado na técnica de ELISA é uma placa de micro titulação (ou microplaca), que consiste num “tabuleiro” plano com vários compartimentos individuais (poços) dispostos em linhas e colunas, formando uma matriz 2:3. Os formatos mais utilizados possuem 96 ou 384 poços. São fabricadas a partir de um polímero (poliestireno ou polipropileno) e são utilizadas para examinar as características físicas, químicas ou biológicas de várias amostras em em simultâneo. As amostras ficam dispostas na matriz formada pelos poços da microplaca <sup>[25]</sup>.

A invenção desta ferramenta remonta a 1951, quando o médico e inventor húngaro, Dr. Gyula Takátsy, construiu à mão a primeira microplaca. Numa microplaca de acrílico construiu 6 linhas de 12 poços que juntamente com um dispositivo de deposição com várias pontas (pipeta multicanal), permitiam a realização de vários ensaios em simultâneo. Esta invenção surgiu no contexto de uma epidemia de gripe na Hungria, que suscitou a procura de um método de diagnóstico rápido económico e eficaz. Realizando vários ensaios em simultâneo, a invenção de Dr. Takátsy permitiu reduções significativas no tempo de realização e volumes de amostra utilizados por cada teste, o que aumentou significativamente o rendimento do seu laboratório. Desde então as microplacas evoluíram, tornando-se num dos equipamentos descartáveis mais comuns em laboratórios <sup>[26]</sup>.

O formato mais convencional consiste em 96 poços individuais dispostos em oito linhas e doze colunas com dimensões definidas pelo *American National Standards Institute* em 1996. O material utilizado é poliestireno, de alta transparência e o fundo chato e plano, (**figura 2.8**) <sup>[27]</sup>.



**Figura 2.8:** Microplaca transparente de poliestireno com 96 poços.

De uma forma geral as microplacas facilitam a realização de ensaios, diminuindo o tempo de execução, pois é possível efetuar vários ensaios em simultâneo e por outro lado, permite o uso de sistemas automatizados de manuseamento de líquidos, o erro associado ao utilizador.

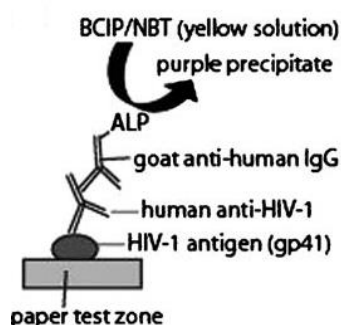
As microplacas têm um vasto historial de aplicações, em virologia e serologia, como o caso dos ensaios imunoenzimáticos ainda hoje amplamente utilizados nos laboratórios clínicos.

O avanço tecnológico tem permitido uma crescente miniaturização de vários tipos de ensaios laboratoriais, o que tem motivado a procura de microplacas com poços menores e maior número de poços de modo a aumentar o rendimento dos laboratórios e diminuir a quantidade de reagentes necessários por cada ensaio <sup>[27]</sup>.

Idealmente procura-se reduzir o custo de produção, bem como simplificar a obtenção dos resultados, de modo a dispensar a utilização de equipamentos complexos e potencialmente dispendiosos. Na concretização deste objetivo, um dos fatores a ter em conta é a escolha do suporte onde se realiza o ensaio, visto que tem um papel ativo na imobilização de reagentes. Por isso, este estudo centra-se na mudança de suporte de poliestireno utilizado nos ensaio ELISA para um suporte de papel.

### 2.2.1.1. Suporte em papel

O primeiro estudo publicado sobre a tecnologia *Lab-on-Paper* utilizando a técnica de ELISA em suporte de papel, foi em 2010 por Cheng, Chao-Min e seus colaboradores. A técnica foi desenvolvida para deteção de anticorpos específicos para HIV-1 gp41 em soro humano (**figura 2.9**)



**Figura 2.9:** Representação esquemática dos anticorpos e antígenios do ensaio de ELISA em papel para a deteção de anticorpos para o HIV - 1 gp41. Adaptado de Cheng Chao-Min <sup>[28]</sup>.

Numa revisão bibliográfica utilizando a palavra *Paper-Based ELISA* revelou que esta é uma área recente e com grandes potencialidades, tendo até ao momento (fevereiro de 2016) sido publicados somente mais 8 artigos na área da saúde e diagnóstico em que se utiliza ensaios imunoenzimáticos em papel, estando estes apresentados na **tabela 2.3**.

**Tabela 2.3:** Sensores desenvolvidos com a tecnologia *Lab-on-Paper*.

Função do sensor	Referência
Deteção de Ag cancerígenos	Wang, Shoumei e col., 2012 <sup>[29]</sup>
Monitorização do desempenho cognitivo através de biomarcadores neuropeptídeos	Murdock, Richard e col., 2013 <sup>[30]</sup>
Motorização de doenças vasculares da retina	Hsu, Min-Yen e col., 2014 <sup>[31]</sup>
Diagnóstico de leishmaniose canina	Costa, M e col., 2014 <sup>[32]</sup>
Diagnóstico de doenças autoimunes (penfigóide bolhoso)	Hsu, Chao-Kai e col., 2014 <sup>[33]</sup>
Deteção de bactérias ( <i>Escherichia coli</i> )	Shih, Cheng-Min e col., 2015 <sup>[34]</sup>
Deteção do vírus bacteriófago T7	Khana, Mohidus e col., 2015 <sup>[35]</sup>

Em todas estas aplicações foi utilizado a tecnologia *Lab-on-Paper* em papel Whatman.

Verifica-se que a sensibilidade reportada no caso do sensor para deteção do vírus bacteriófago T7 é de  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL, atingindo o valor de  $10^4$  UFC/mL quando se utiliza um volume de amostra de 100 mL. Quanto à sensibilidade do sensor para deteção da bactéria *E.coli* é de  $10^5$  UFC/mL.

No presente trabalho desenvolveu-se um teste ELISA em papel para a deteção de *Legionella pneumophila*, que seja do nosso conhecimento, este é a primeira vez que se aplica a tecnologia *Lab-on-Paper* para deteção deste microrganismo. Para além disso, o nosso grupo foi o único que utilizou, para além do papel Whatman, o papel de fotocópia, por forma a reduzir o custo do ensaio, uma vez que este é substancialmente mais económico.

### 2.2.2. Imunoreagentes

Podem considerar-se duas etapas na técnica de ELISA: a reação primária entre os imunoreagentes (Ag e anticorpos correspondente) e a deteção usando enzimas como indicadores, previamente ligadas aos reagentes <sup>[36]</sup>.

Os anticorpos são proteínas específicas que se ligam a uma parte restrita do antigénio, o epitopo, e são produzidas pelos linfócitos B, uma das três classes de glóbulos brancos presentes no sangue <sup>[37]</sup>.

A resposta imunológica a um Ag geralmente envolve ativação de múltiplas células-B as quais têm como alvo epítomos específicos no Ag. Como resultado um elevado número de diferentes anticorpos são produzidos, com variadas afinidades e especificidades relativamente aos diferentes epítomos do Ag. Estes são conhecidos como anticorpos policlonais e têm:

- Propriedades heterogéneas;
- Baixa pureza;
- Baixo custo de produção;
- Produção rápida;
- Menos específico.

Estes anticorpos como são menos específicos, ocorre com maior frequência reacções cruzadas relevando falsos positivos, principalmente com proteínas com afinidade para se ligar aos anticorpos.

De entre os variados métodos de marcação de anticorpos e Ag desenvolvidos nas últimas décadas do século XX, o mais promissor utiliza enzimas <sup>[38]</sup>.

As enzimas são macromoléculas de natureza proteica com função biológica de alto poder catalítico de reacções químicas e elevada especificidade ao correspondente substrato.

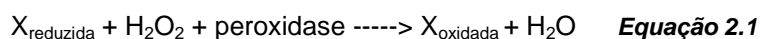
Estas podem ser conjugadas com anticorpos e Ag de modo a formar complexos que mantêm a atividade imunológica e enzimática. A degradação enzimática de um substrato cromogéneo resulta na amplificação do sinal e permite a deteção específica da enzima <sup>[38]</sup>.

As enzimas são altamente ativas e podem ser detetadas a baixas concentrações e por isso são usadas eficazmente como marcadores enzimáticos. Com a utilização de enzimas obtém-se uma sensibilidade semelhante à dos marcadores radioativos, apresentando a vantagem de serem mais estáveis, baratas e seguras, podendo ser usados com sucesso sem recorrer a equipamento caro e sofisticado <sup>[39]</sup>.

Existe duas enzimas que são normalmente usadas na conjugação de anticorpos: a fosfatase alcalina (AP) e a peroxidase de rábano (horseradish peroxidase - HRP). A HRP é mais barata que a AP, sendo contudo considerada menos fiável, uma vez que pode conter polifenol-oxidases ou peroxidases que podem hidrolisar o substrato e conduzir, assim, a resultados falsos positivos. Mas este facto pode ser facilmente ultrapassado com a realização de amostras de controlo, os chamados brancos.

Esta enzima funciona a valores de pH próximos do neutro e é encontrada nas raízes de rábano. A HRP catalisa a conversão de substratos cromogéneos (por exemplo, TMB , DAB , ABTS ) em produtos coloridos <sup>[38]</sup>.

As peroxidases são um grupo de enzimas oxirredutases que oxidam substratos orgânicos, tendo o peróxido de hidrogénio como molécula aceitadora de eletrões. A reacção é denominada peroxidação, sendo descrita pela **equação 2.1**:

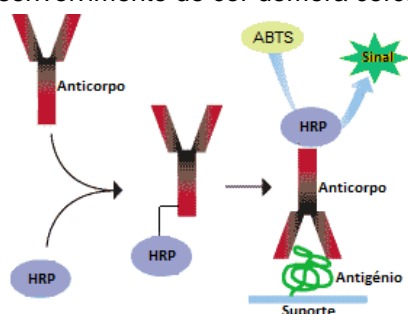


Sendo o X a molécula que sofre peroxidação.

O substrato utilizado neste trabalho é o ABTS 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). Este substrato é muito usado para observar as cinéticas de reacção específicas de uma enzima e o seu principal uso é em ensaios de ELISA para detetar a ligação das moléculas umas às outras.

A enzima HRP, utilizada no presente trabalho, que está acoplada ao anticorpo vai reduzir o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que é adicionado, através da oxidação do cromogéneo ABTS, que vai atuar como um

dador de elétrons para a redução do  $H_2O_2$  produzindo uma cor verde (figura 2.10). O desenvolvimento de cor demora cerca de 20 minutos<sup>[40]</sup>.



**Figura 2.10:** Esquema do anticorpo com a enzima HRP num ensaio de ELISA direto.

Os Ag são moléculas estranhas ao organismo que ao entrarem, desencadeiam mecanismos de defesa, como por exemplo, produção de anticorpos.

No ensaio imunoenzimático desenvolvido neste trabalho, o Ag utilizado é a bactéria *L. pneumophila* sg 1 intacta, ou seja o organismo completo sem nenhum tratamento prévio.

### 2.3. *Legionella pneumophila*

A *L. pneumophila* é uma espécie que pertence à família *Legionellaceae* e apresenta 16 serogrupos, ou seja, dentro desta espécie existem 16 serotipos diferentes. Esta bactéria é frequentemente encontrada em ambientes aquáticos não salinos, artificiais e naturais. Geralmente está presente nos ambientes naturais em baixas concentrações ( $10^2$  a  $10^4$  bactérias/L) mas, nos ambientes artificiais pode atingir concentrações muito elevadas, principalmente em sistemas que envolvem aquecimento de água<sup>[41]</sup>.

A *L. pneumophila* é uma bactéria Gram-negativa, heterotrófica (não produz o seu próprio alimento), estritamente aeróbia (precisa de oxigênio para o seu desenvolvimento), possui forma de bastonete com 2-6  $\mu m$  de comprimento e não forma esporos. Porém, *in vitro*, em culturas com vários dias ou após passagens sucessivas, pode apresentar formas filamentosas que chegam a atingir 90  $\mu m$  de comprimento. Apresenta mobilidade por um ou mais flagelos polares ou laterais, sendo que algumas estirpes não apresentam mobilidade. A diferença fenotípica entre estirpes virulentas e avirulentas é a presença do flagelo<sup>[42]</sup>.

As bactérias do género *Legionella* vivem associadas a outros organismos heterotróficos, principalmente protozoários do grupo *Amoebae*, com o qual interagem a nível trófico recebendo os nutrientes de que necessitam como, por exemplo, a cisteína. São capazes de sobreviver numa ampla gama de condições ambientais que incluem variações de temperatura dos 5°C aos 63°C e de pH dos 5,5 aos 8,9<sup>[42]</sup>.

#### 2.3.1. Condições de crescimento em laboratório

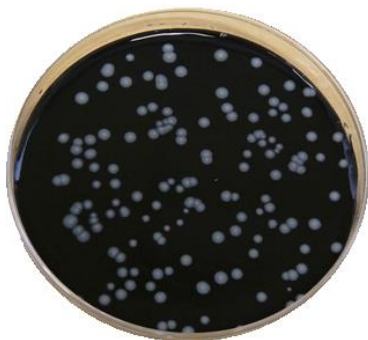
Estas bactérias têm um crescimento lento e não se desenvolvem nos meios de cultura normalmente usados em laboratório, pois necessitam de nutrientes específicos para o seu crescimento *in vitro*. Assim, os meios de cultura utilizados no laboratório necessitam de ser

suplementados com sais de ferro e L-cisteína, a bactéria *Legionella* é auxotrófica para cisteína, ou seja, é incapaz de sintetizar a cisteína que necessita para o seu próprio crescimento <sup>[41]</sup>.

Durante o crescimento *in vitro*, a bactéria *Legionella* produz metabolitos tóxicos, tais como, a produção de radicais superóxido e peróxidos, sobretudo após exposição à luz. Para evitar esta situação adiciona-se carvão vegetal ao meio de cultura. Este devido à sua estrutura porosa e constituição química tem ótimas propriedades adsorventes.

O meio de cultura recomendado para o isolamento primário e crescimento das bactérias do género *Legionella* é o agar BCYE (*buffured charcoal yeast extract*), ou seja é uma solução de extrato de levedura (fonte rica em nutrientes) e carvão vegetal. É um meio fortemente tamponizado que contém cisteína e sais férricos. É um meio seletivo que permite o isolamento e identificação de espécies de *Legionella* em amostras clínicas e ambientais. O seu pH ótimo é de 6.9. A temperatura ótima para incubação das placas é de 37°C e as colónias demoram cerca de 3 dias a desenvolverem-se. Em culturas primárias, podemos ter que aguardar 10 dias para que o desenvolvimento seja visível. Quando as estirpes já estão adaptadas aos meios de laboratório, por passagens sucessivas, podemos ter colónias visíveis ao fim de 24 horas de incubação <sup>[42]</sup>.

Estas apresentam forma circular, de diâmetro variável, são convexas e de margem inteira, têm tom anilado e superfície lisa com brilho vítreo muito característico como podemos ver pela **figura 2.11**, podendo tornar-se viscosas com o envelhecimento da cultura <sup>[42]</sup>.



**Figura 2.11:** Imagem de *Legionella* em placa no meio BCYE. Tempo de incubação de 5 dias a 37°C. Observação à lupa com ampliação de 40x.

As bactérias deste género são pouco coradas pelo método de *Gram*, devido à constituição da sua membrana. Esta possui cadeias de ácidos gordos ramificados, que dificultam a fixação da solução de safranina, corante de contraste utilizado neste método <sup>[42]</sup>.

O método de *Gram* é um método de coloração de bactérias que consiste em tratar sucessivamente um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com reagentes. As bacterias que adquirem a coloração azul violeta são chamadas de *Gram-positivas* e aquelas que adquirem a coloração vermelha são chamadas de *Gram-negativas*.

### 2.3.2. Patogenicidade

A principal espécie causadora de doença no homem é a *L. pneumophila*, sendo o serogrupo 1 (sg1) o que predominantemente causa infeções no Homem, seguindo-se os sg4 e 6. Este agente patogénico necessita de um hospedeiro para se conseguir multiplicar. A principal

característica de patogenicidade da bactéria *Legionella* é a capacidade de se multiplicar intracelularmente em células eucariotas, como por exemplo nos macrófagos humanos <sup>[41]</sup>.

O risco de contaminação humana por esta bactéria ocorre por inalação de água contaminada, sob a forma de aerossóis, ou por microaspiração. Os aerossóis são criados geralmente em instalações onde a temperatura da água está compreendida entre os 25 e 42°C, tais como: sistemas de água quente (piscinas, jacúzis, banheiras a jato), fontes decorativas, sistemas de climatização, torres de refrigeração de ar condicionado, chuveiros e nebulizadores <sup>[41]</sup>.

Os fatores que contribuem para a sobrevivência, desenvolvimento e multiplicação desta bactéria nos sistemas de distribuição de água, por longos períodos de tempo são <sup>[41]</sup>:

- Presença de alguns nutrientes (ferro, azoto) necessários para sobreviver;
- Ocorrência de estagnação da água;
- Formação de biofilmes (agregados de microrganismos aderidos a uma matriz constituída por substâncias poliméricas extracelulares excretadas por eles) que os protege das desinfecções químicas/térmicas.

Quando a bactéria *Legionella* atinge o aparelho respiratório inferior do ser humano, esta é fagocitada por macrófagos alveolares e começa a multiplicar-se. As bactérias libertadas após este processo de replicação no interior dos macrófagos podem então infetar outros macrófagos aumentando a concentração bacteriana nos pulmões e provocando uma doença pulmonar aguda conhecida como Doença dos Legionários. Pode ainda, ocorrer uma leve doença febril designada por febre de Pontiac.

As infeções provocadas pela bactéria *Legionella* são consideradas atualmente um problema emergente de saúde pública e estão associadas a altas taxas de morbidade e de mortalidade (15-20%), sendo 85% dos casos provocados pela *L pneumophila* sg1 <sup>[41]</sup>.

As pessoas mais afetadas, são pessoas com o sistema imunológico debilitado (como por exemplo, imunodeprimidos, pessoas com doenças respiratórias crónicas ou que realizaram tratamento com corticosteroides) e com idade avançada (superior a 50 anos), sendo que os homens são mais afetados do que as mulheres <sup>[41]</sup>.

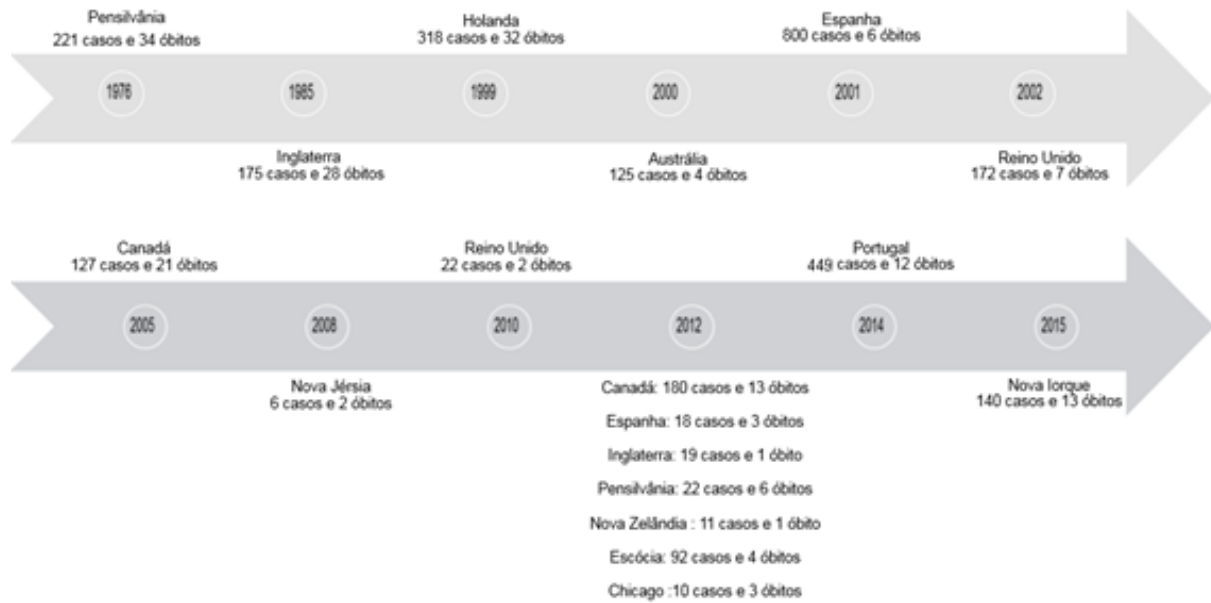
Para que haja a infeção em humanos é necessário <sup>[41]</sup>:

- 1- Existência de um reservatório contaminado com *Legionella*;
- 2- Amplificação do inoculo originando um aumento drástico da concentração da bactéria;
- 3- A existência de um mecanismo disseminador (gerador de aerossóis) para uma população suscetível;
- 4- A estirpe disseminada ser virulenta para humanos;

Até ao momento não havia evidência de transmissão inter-humana, no entanto, em fevereiro 2016 foi pela primeira vez reportado um possível caso (Correia e col, 2016), deixando em aberto esta possibilidade <sup>[43]</sup>.

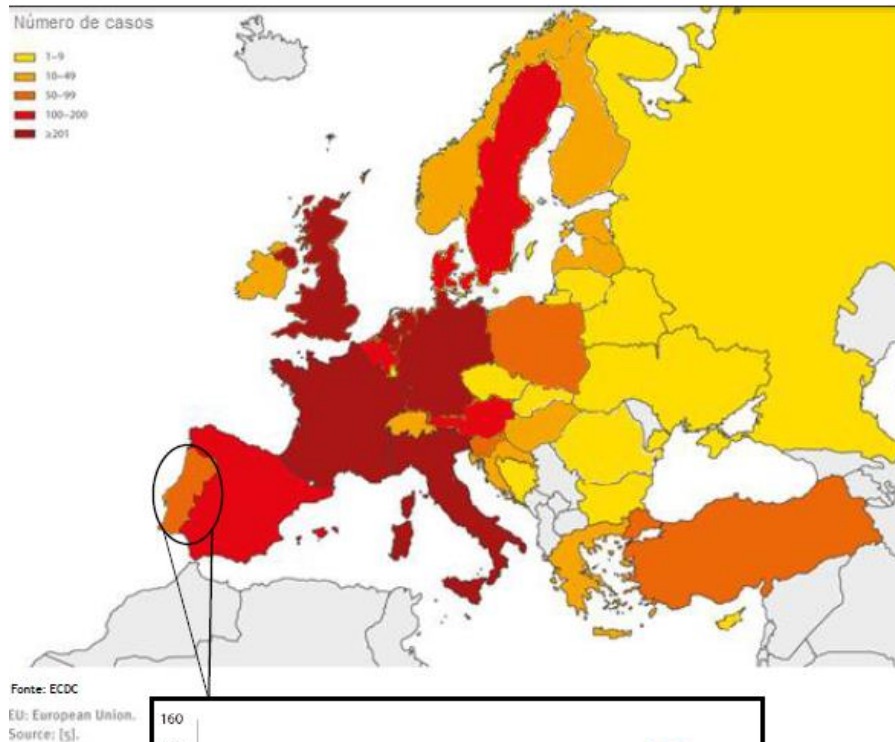
### 2.3.2.1. Surtos

O surto é um aumento súbito e temporário de casos de uma patologia numa determinada área. Na qual, os casos estão relacionados entre si, atingindo uma área geográfica delimitada ou uma população restrita a uma instituição, por exemplo colégios, quartéis, fábricas. Os surtos de Doença dos Legionários começaram a ser registados a partir da década de 70 e desenvolvem-se sobretudo nos países desenvolvidos ocorrendo a nível mundial (**figura 2.12 e 2.13**). A maioria destes surtos tem origem em sistemas de arrefecimento e ar condicionados de edifícios públicos, hotéis, industrias, entre outros.

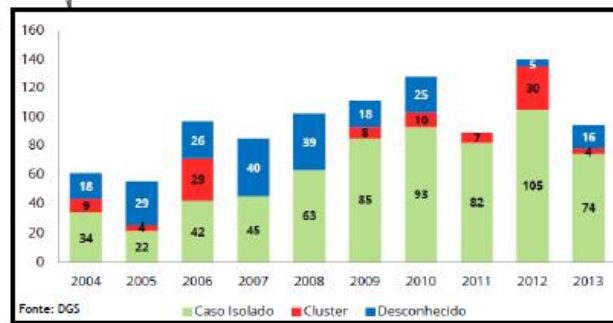


**Figura 2.12:** Barra cronológica dos surtos de Doença dos Legionários registados mundialmente e respetivos números de casos e óbitos. Dados obtidos de Fraser, et al; Greig, et al<sup>[44,45]</sup>.

(A)



(B)



**Figura 2.13:** Número de casos de doenças dos Legionários notificados. **(A)** na Europa em 2013. Dados obtidos do relatório da ECDC SURVEILLANCE REPORT Legionnaires' disease in Europe 2013. **(B)** em Portugal de 2004 a 2013. Adaptado do relatório da DGS "Vigilância em saúde pública: Doença dos Legionários em Portugal 2004-2013.

### 2.3.2.2. Diagnóstico (ELISA)

Para a identificação de surtos epidémicos a determinação do Ag urinário, isto é antígenúria para *Legionella*, é o diagnóstico mais utilizado por permitir uma resposta rápida das autoridades de saúde.

Uma vez que as pneumonias provocadas pelas legionelas quando não tratadas podem ser fatais, é de vital importância um rápido diagnóstico. A técnica ELISA é uma das metodologias utilizadas para pesquisa do Ag urinário, sendo realizada em poucas horas.

A deteção de Ag de *L. pneumophila* na urina dos pacientes através de um ensaio ELISA foi descrito pela primeira vez em 1979 [46]. Tendo em 1990 Birtles e colaboradores desenvolvido um ensaio em Inglaterra que apresenta uma especificidade de 100%, sensibilidade de 90% e uma boa reprodutibilidade, mas apenas para a deteção do Ag solúvel da *L. pneumophila* sg 1 [47].

Sabe-se que o Ag começa a ser excretado na urina muito cedo, nos três primeiros dias após o início dos sintomas, e termina após 10 a 14 dias. Em casos excecionais pode persistir por

mais de 100 dias, o que dificulta a interpretação dos resultados em doentes com pneumonia recorrente <sup>[47]</sup>.

Este método tem a vantagem de o diagnóstico não ser afetado pela administração de antibiótico e a obtenção das amostras ser muito fácil <sup>[42]</sup>.

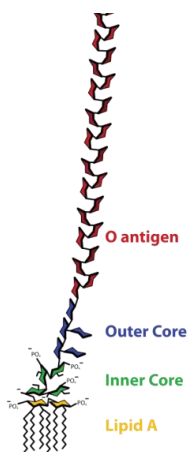
Com os reagentes comercializados hoje em dia apenas podemos diagnosticar infeções por *L. pneumophila* sg 1 e devido à grande variabilidade antigénica das *L. pneumophila* (16 serogrupos já descritos) é importante ter em conta que um resultado negativo de antigenúria, não exclui o diagnóstico de Doença dos Legionários <sup>[42]</sup>.

### 2.3.2.3. Características antigénicas

O principal Ag somático (O) da bactéria *Legionella*, contra o qual se formam anticorpos na infeção natural, é o LPS da parede celular, um lipopolissacarídeo que é uma endotoxina que provoca uma forte resposta por parte de sistemas imunitários de animais saudáveis.

É também um dos componentes principais da membrana exterior de bactérias gram-negativas e é composto por um antígeno O (parte mais externa), um núcleo externo, um núcleo interno e um lipídeo A (parte mais interna), como podemos verificar pela **figura 2.14** <sup>[48]</sup>.

Este é um Ag específico da espécie, sendo a especificidade do serogrupo conferida pelas cadeias laterais O do LPS <sup>[48]</sup>.



**Figura 2.14:** Estrutura do lipopolissacarídeo (LPS).

A natureza do Ag encontrado na urina das pessoas infetadas por *L. pneumophila* não é totalmente conhecida mas presume-se que seja um produto de degradação do LPS <sup>[42]</sup>.

As propriedades do LPS destas bactérias então provavelmente relacionadas com a invulgar composição em ácidos gordos da *L. pneumophila* <sup>[42]</sup>.

## 2.4. Técnicas de caracterização

As técnicas de caracterização utilizadas no decorrer deste trabalho foram selecionadas com o intuito de obter informações sobre a densidade ótica das suspensões bacterianas, estrutura e morfologia das bactérias *L. pneumophila* em suspensão e no sensor de papel.

Será apresentada uma revisão teórica acerca das técnicas usadas para caraterizar.

### 2.4.1. Espectrofotómetro de UV/Visível

Espectrofotómetros de UV/visível são equipamentos usados há mais de 35 anos e durante esse período tornaram-se nos mais importantes instrumentos de análise em laboratórios modernos.

Quando um feixe de radiação incide num objeto pode ser absorvido, transmitido, dispersado, refletido ou pode provocar fluorescência.

Um feixe de luz num determinado comprimento de onda interage com uma amostra a luz pode ser totalmente refletida, o que faz com que a amostra tenha cor branca, ou pode ser totalmente absorvida se a amostra for preta. No entanto, se apenas uma porção de luz for absorvida e a restante for refletida, a cor da amostra pode ser determinada pela luz reflectida (refletância) ou pela luz absorvida pela amostra (absorvância).

O fenómeno envolvido na espectrofotometria de absorvância é a absorção. Existem muitas substâncias que não exibem cor, pelo que não absorvem no intervalo de comprimentos de onda da zona do visível. Nestes casos a absorção ocorre na zona infravermelha ou ultravioleta do espectro eletromagnético.

Existe uma relação próxima entre a cor de uma substância e a sua estrutura atómica. Uma molécula ou ião absorvem comprimentos de onda visíveis quando a radiação provoca uma transição eletrónica nas orbitais dos seus átomos <sup>[49]</sup>.

#### **2.4.2. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)**

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) permite obter imagens semelhantes às que se obtêm por microscopia ótica de reflexão, mas numa gama de ampliação extraordinariamente superior (desde 10x até 18000x) e com uma profundidade de campo de 30  $\mu\text{m}$ . Isto deve-se à utilização de um feixe de eletrões cujo comprimento de onda ( $\lambda_e = 0,012 \text{ nm}$ ) é muito inferior ao dos fotões de luz visível ( $400 \text{ nm} < \lambda_{\text{visível}} < 700 \text{ nm}$ ).

O funcionamento do SEM baseia-se no varrimento da superfície da amostra em observação pelo feixe de eletrões. Quando os eletrões penetram na amostra vão interagir com o meio causando a emissão de eletrões e fotões da superfície.

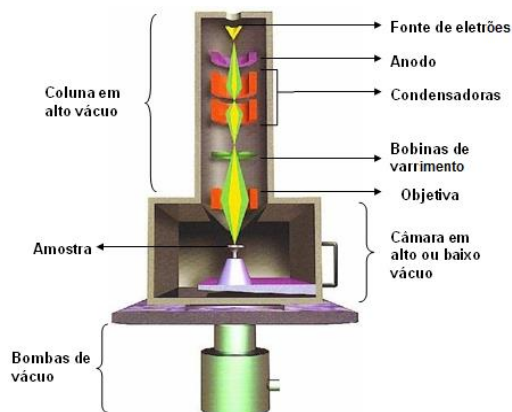
O princípio de funcionamento baseia-se na incidência de um feixe de eletrões (elétrodo negativo) por um filamento capilar de tungstênio num ponto da superfície da amostra-alvo, e a subsequente recolha dos sinais eletrónicos emitidos pelo material-alvo. As amostras são percorridas sequencialmente por um feixe de eletrões acelerado por uma tensão que varia entre 0 e 40 kV que são acelerados em direção ao elétrodo positivo e finamente focado através de um sistema de lentes eletromagnéticas. A correção da direção do feixe, nesse percurso, é realizada por lentes condensadoras que alinham o feixe em direção à abertura da lente objetiva. A objetiva ajusta o foco do feixe antes dos eletrões atingirem a amostra que será analisada. A imagem é assim obtida pelo varrimento do feixe eletrónico incidente sobre a superfície da amostra. Depois da amplificação e processamento apropriados, um detetor de eletrões é responsável pela geração da imagem mostrando-a no visor. A SEM produz imagens de alta resolução, o que garante obter grande ampliação de detalhes (até 300.000 vezes) sem perda de nitidez <sup>[50]</sup>.

Da interação do feixe eletrónico com a amostra resulta a emissão de diversos tipos de radiação e eletrões, entre os quais os eletrões secundários (ES) utilizados na formulação da imagem da amostra (com energias inferiores a 50 eV). Os eletrões secundários são eletrões da amostra que sofrem excitação e “escapando-se” da superfície, obtêm-se imagens da topografia da superfície. Os eletrões retrodifundidos (ER) permitem a distinção, na amostra em análise, de regiões de átomos leves e pesados, proporcionando imagens com diferença de contraste de acordo com o elemento que está a ser analisado, por exemplo, elementos pesados como o ferro aparecem mais claros e elementos leves como o carbono aparecem mais escuros <sup>[50]</sup>.

As amostras para poderem ser caracterizadas por microscopia eletrónica têm de satisfazer as seguintes condições:

- ✓ Apresentar boa condutividade elétrica superficial, a não existência de condutividade superficial leva à necessidade de metalização, através da aplicação de um revestimento ultrafino de um metal, de ouro ou carbono. Para tal, o metal é aquecido sob vácuo e ao vaporizar-se, deposita-se;
- ✓ Suportar o vácuo, a técnica SEM utiliza um feixe de eletrões (em vez da luz – utilizada na microscopia ótica), o que torna necessário a utilização de vácuo;
- ✓ Estabilidade física e química, nas condições de observação / interação com o feixe eletromagnético.

O microscópio eletrónico de varrimento é constituído por: fonte de eletrões, sistema de lentes, bobinas de varrimento, coletor de eletrões e por um tubo de raios catódico (**figura 2.15**).



**Figura 2.15:** Representação esquemática de um equipamento de SEM. Adaptado de Jacob <sup>[15]</sup>.

A utilização do SEM é um importante e versátil método de caracterização da morfologia de materiais e amostras biológicas. A preparação de amostras biológicas para serem observadas em SEM compreende três etapas principais: a fixação, desidratação e a metalização. A fixação serve para preservar a sua estrutura e é feita por incubação da amostra numa solução fixadora, como gluteraldeído ou formaldeído. De seguida, é necessário desidratar substituindo a água por um solvente orgânico, como o etanol ou acetona. Por fim procede-se à deposição de uma camada ultrafina de um material eletricamente condutor (por exemplo, ouro, platina, crómio), por evaporação de alto vácuo ou por *sputtering* de baixo vácuo (pulverização catódica através do bombardeamento de átomos ou iões ocorrendo a erosão do material).

## Capítulo 3

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos todos os procedimentos experimentais e materiais usados durante o trabalho.

#### 3.1. Construção do sensor de papel

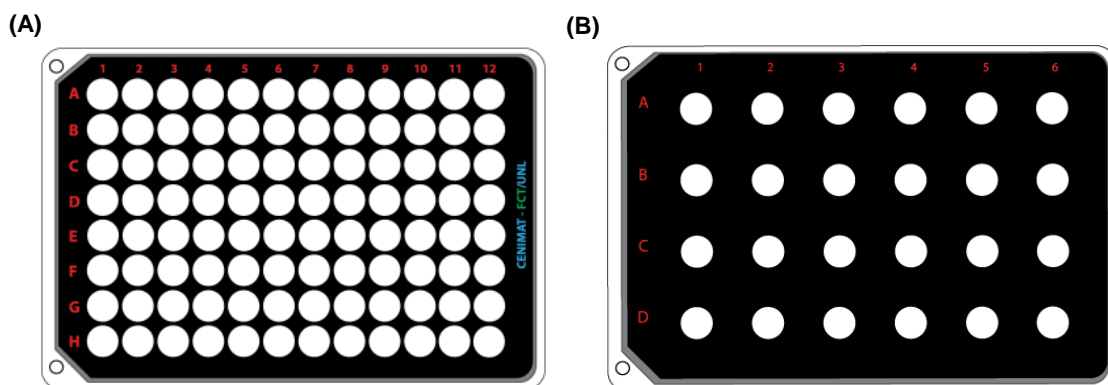
Para a construção do sensor de papel foi utilizada a tecnologia *Lab-on-Paper* que compreende as seguintes etapas:

##### i. Desenho do protótipo

O *design* do sensor de papel e dos padrões de cera foram feitos com recurso a um *software* de desenho vetorial – *Adobe Illustrator*. Os poços foram desenhados com largura de linha de 0,5 mm e encontram-se distanciados uns dos outros por 1 mm.

A **figura 3.1A** ilustra o *design* do primeiro sensor de papel utilizado neste ensaio, com poços de dimensões 7 x 7 mm, de forma a assemelhar-se a microplacas convencionais de 96 poços, sendo a parte preta a cera hidrofóbica e a parte branca o papel.

O *design* do sensor de papel foi posteriormente alterado, tendo-se diminuído o número de poços para 24 mas manteve-se as mesmas dimensões. Esta alteração serviu para reforçar a barreira hidrofóbica e garantir que o líquido não sai do espaço confinado à realização do ensaio de ELISA, evitando assim as contaminações (**figura 3.1B**).



**Figura 3.1:** Protótipo do sensor de papel. (A) Primeiro design; (B) Design alterado.

##### ii. Preparação dos substratos de papel

Os dois substratos de papel usados foram: papel de filtro Whatman nº 1 e papel de fotocópia. O papel Whatman nº1, *Whatman Cellulose Chromatography Paper Grade 1* (Whatman Internacional Ltd., Florham Park, NJ, USA), adquirido na forma de folhas de tamanho 570 x 460 mm, foi cortado em folhas de tamanho *standard A5* (210 x 148 mm).

O papel de fotocópia branco (300% Iberpapel) foi adquirido em formato A4 (297 x 210 mm). Este formato é adequado para o tabuleiro da impressora e como tal, não sofreu qualquer preparação prévia.

Todos os substratos mencionados foram conservados em ambiente seco e não foram submetidos a nenhum tratamento adicional antes de serem utilizados.

### iii. Impressão da cera

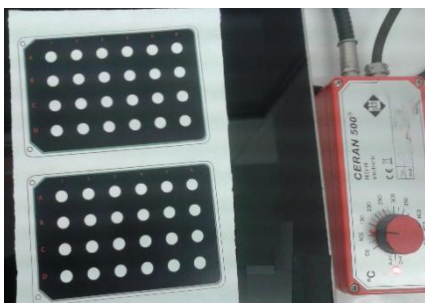
Neste trabalho foi usada uma impressora *Xerox ColorQube 8570* (*Xerox Corporation, Norwalk, CT, USA*) (**figura 3.2A**) para depositar camadas de material hidrofóbico sobre o substrato. Neste equipamento o reservatório de tinta é um bloco de cera sólida *Xerox* (**figura 3.2B**) que funde a baixas temperaturas. Usando esta impressora, foi possível criar padrões complexos, bem como reproduzi-los e alterá-los com facilidade. As definições da impressora foram ajustadas de modo a ser depositada a máxima quantidade de cera possível sem diminuir o tamanho dos poços quando difundida a cera. No caso do papel de fotocópia foi impresso no modo *Photo* e do papel Whatman no modo *Enhancer*.



**Figura 3.2:** Material utilizado para a impressão da cera. (A) impressora de cera sólida *Xerox ColorQube 8570*; (B) tinteiros de cera sólida *Xerox*.

### iv. Difusão da cera

Para difundir a cera e criar as barreiras hidrofóbicas foi usada uma placa de aquecimento, uma vez que proporciona uma superfície lisa e uma temperatura constante de 140 °C durante 2 minutos, permitindo um aquecimento uniforme dos dispositivos de forma a difundir a cera por toda a espessura do papel (**figura 3.3**).



**Figura 3.3:** Processo de difusão da cera com uma placa de aquecimento *Robox*, equipamento existente no *CENIMAT/13N*.

No caso do papel de fotocópia, embora este apresente já uma superfície hidrofóbica continua a ser necessária a definição das barreiras hidrofóbicas de forma a ser possível o confinamento de líquidos a uma determinada área.

No final desta etapa o sensor de papel está pronto para ser utilizado para a realização do ensaio de ELISA.

### 3.2. Solução de antígeno

A solução de Ag utilizada foi a cultura de uma estirpe de *L. pneumophila* sg 1 isolada no contexto de um surto de comunidade ocorrido no norte de Portugal em novembro de 2009 e pertencente coleção da unidade curricular de infeção da NMS/FCM.

Para a preparação da solução de antígeno incubou-se a estirpe durante 48h a 37°C em meio sólido de BCYE –  $\alpha$  (preparação do meio encontra-se em **anexo A**). De seguida realizou-se uma suspensão de *L. pneumophila* sg1 em tampão PBS e mediu-se a absorvância da suspensão no espectrofotómetro de UV/Visível (Shimadzu, UV-1700 Pharmaspec) (**figura 3.4**) a um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 550 nm. A absorvância foi ajustada até atingir o valor de  $1,2 \pm 0,1$ .

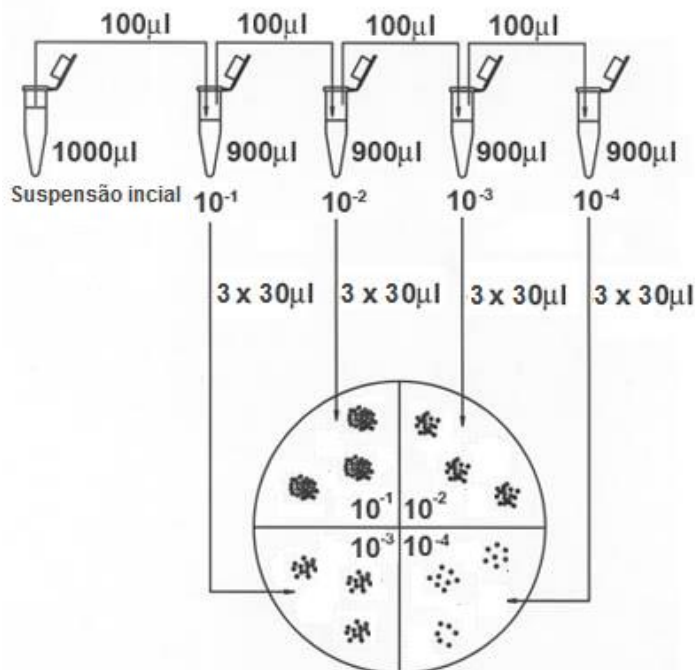


**Figura 3.4:** Espectrofotómetro de UV/Visível utilizado, equipamento existente na Nova Medical School, FCM-UNL.

#### 3.2.1. Técnica Drop-plate

Através da técnica *drop-plate* quantificou-se a suspensão de *L. pneumophila* sg1.

A técnica de *drop-plate* foi desenvolvida por Miles e seus colaboradores em 1938 e consiste no plaqueamento de 30  $\mu$ L em triplicado de diluições seriada de 1/10 de uma suspensão bacteriana (**figura 3.5**). A quantificação efetua-se na diluição onde a contagem das unidades formadoras de colónias (UFC) está entre 3 a 30 UFC.



**Figura 3.5:** Esquema ilustrativo da técnica drop-plate.

### 3.3. Ensaio de ELISA

Em todos os ensaios de ELISA foi efetuado um branco, em que a amostra apenas contém tampão PBS, isto é, sem adição da bactéria *L. pneumophila*.

Antes do ensaio foi necessário a preparação das seguintes soluções:

**- Solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS 10x):**

20 g Cloreto de Sódio (NaCl) – Merck, ≥ 99,5%;

3,6 g Fosfato Hidrogeno di-Sódio anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) – Applichem-Biochemica, ≥ 99%;

0,6 g Fosfato di-Hidrogeno de Potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) – Merck, ≥ 99,5%;

0,5 g Cloreto de Potássio (KCl) – Merck;

250 mL de água Mili-Q (acertar pH).

**- Solução de revestimento (solução salina tamponada com fosfato pH 7,4) (PBS 1x)**

50 mL PBS 10x em 450 mL de água Mili-Q.

**- Solução salina tamponada com fosfato + 0,05% TWEEN 20 (PBST)**

25 µL de TWEEN 20 em 50 mL PBS.

**- Tampão de bloqueio (5% Molico)**

0,5 g de leite em pó desnatado em 10 mL de PBS.

**- Solução de substrato ABTS pH 4,3**

35 mg ABTS – Biochemica;

100 mL Tampão Citrato/Fosfato (acertar pH)

1 µL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) para cada 1 mL da solução de substrato (preparado na altura).

**- Tampão Citrato/Fosfato**

1,02 g Ácido Cítrico Monohidratado (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O) – Sigma-Aldrich;

1,46 g Fosfato Hidrogeno di-Sódio anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) – Applichem-Biochemica, ≥ 99%;

100 mL água Mili-Q.

**- Tampão carbonato 0,06M pH 9,6**

0,75 g Carbonato di-Sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) – Merck;

1,465 g Hidrogeno carbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) – Applichem-Biochemica, ≥ 99,5%;

500 mL água Mili-Q (acertar pH).

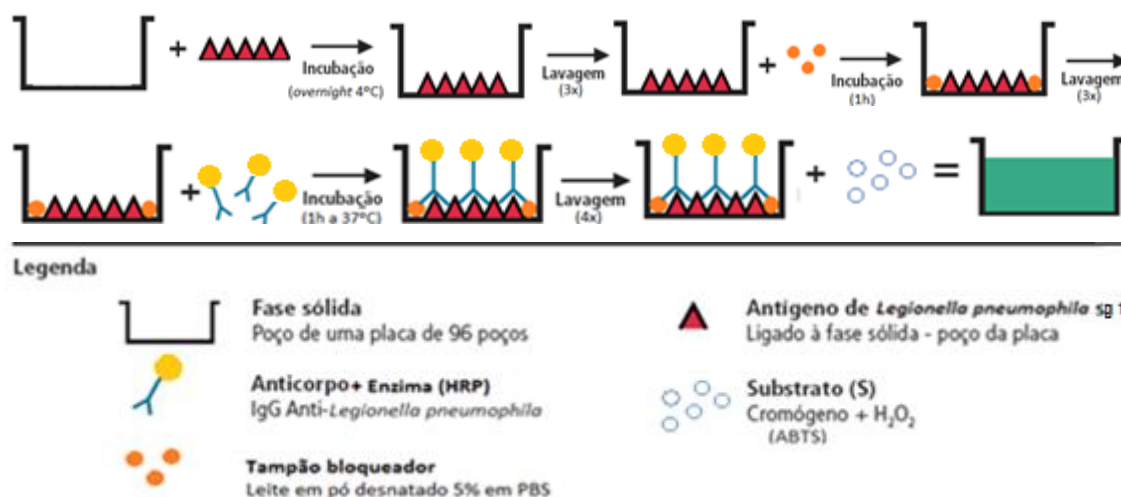
O anticorpo utilizado nos ensaios de ELISA é um anticorpo policlonal de coelho específico contra *L. pneumophila* (USBiological, L1663-08A). Pertence à classe imunoglobulina G (IgG) e está conjugado com uma peroxidase, HRP. Este anticorpo é um anticorpo de detecção testado para ensaios ELISA, sendo recomendada a utilização de uma concentração entre 0,25 e 2 µg/mL

### 3.3.1. Ensaio de ELISA em microplaca poliestireno

A placa utilizada para os ensaios é uma microplaca transparente de poliestireno com 96 poços individuais (marca Sarstedt).

Revestiu-se o poço com 100 µL da suspensão de *L. pneumophila* (Ag), colocou-se a microplaca dentro de um saco isotérmico com papel molhado para criar um ambiente húmido e incubou-se a 4°C *overnight* (18 horas). De seguida lavou-se 3 vezes com 200 µL da solução de lavagem. Posteriormente, adicionou-se 100 µL do tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado em PBS) e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 hora em ambiente húmido. Após este tempo, efetuou-se novamente o processo de lavagem e adicionou-se 100 µL da solução de anticorpo (1-2 µg/mL em tampão PBS). A microplaca foi incubada novamente a 37°C durante 1 hora em ambiente húmido e lavada 4 vezes com 200 µL da solução de lavagem. Adicionou-se 100 µL da solução de substrato ABTS e incubou-se durante 20 minutos à temperatura ambiente para o desenvolvimento da cor verde, isto é a degradação do substrato pela enzima.

O procedimento do ensaio de ELISA em microplaca encontra-se esquematizado na **figura 3.6**.



**Figura 3.6:** Esquema ilustrativo do procedimento do ensaio de ELISA em microplaca.

A leitura foi efetuada num espectrofotómetro próprio para microplaca de ELISA (**figura 3.7**) a um  $\lambda$  de 415 nm, contra o  $\lambda$  de referência de 655 nm.

O cálculo dos resultados foi efetuado através da média do valor da absorvância dos duplicados depois de descontado a média dos duplicados do branco.



**Figura 3.7:** Leitor de microplacas Bio-Rad iMark™ utilizado, equipamento existente no CEDOC.

### 3.3.2. Ensaio de ELISA em papel (papel fotocópia e papel de filtro)

Para a realização deste ensaio foi necessário colocar o sensor de papel em cima de uma caixa de pontas de micropipetas vazia e prendê-lo com um elástico de maneira a ficar suspenso e assim facilitar o seu manuseamento (**figura 3.8**).

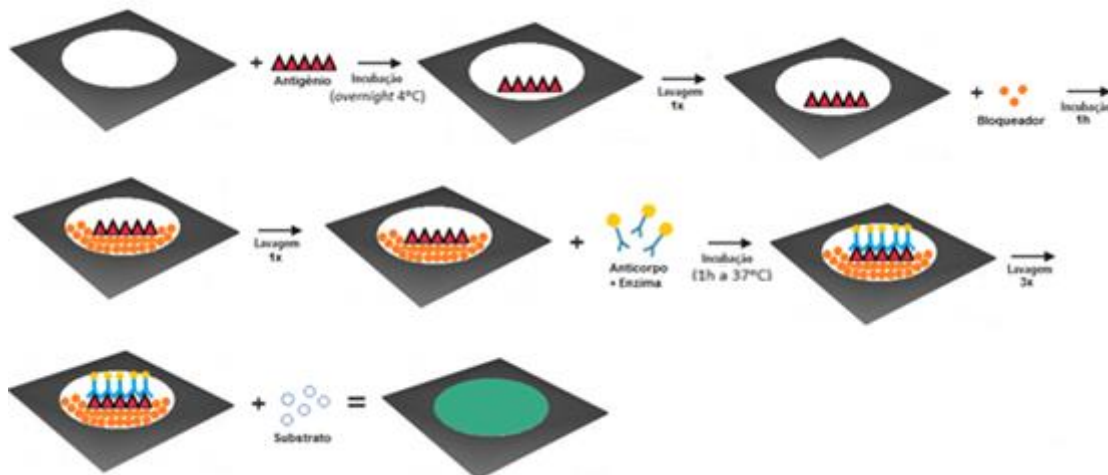


**Figura 3.8:** Sensor de papel pronto para ser utilizado no ensaio.

Numa primeira fase executou-se o procedimento descrito em 3.3.1. Como se verificou que a barreira hidrofóbica era quebrada, acabando o líquido por sair do espaço confinado à realização do ensaio, houve a necessidade de diminuir o volume utilizado e o número de lavagens. Assim, para contornar essa situação, o ensaio foi realizado apenas com uma lavagem a seguir à adição do tampão de bloqueio e três lavagens após a solução de anticorpo. Quanto ao volume de imunoreagentes e de solução de lavagem este foi diminuído para 50 µL.

Para além disso, os ensaios não foram realizados em ambiente húmido pois, o objetivo do papel é que consiga absorver o mais possível.

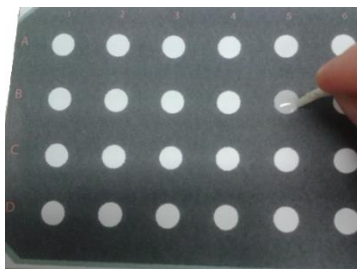
O procedimento da ELISA em papel encontra-se esquematizado na **figura 3.9**.



**Figura 3.9:** Esquema ilustrativo do procedimento do ensaio ELISA em papel.

#### 3.3.2.1. Processo de lavagem

O processo de lavagem também foi otimizado, visto que a utilização da micropipeta não era o mais apropriado uma vez que danificava o papel e não era eficiente. Solucionou-se este problema com a utilização de papel absorvente (Olimpic, 100% celulose) para retirar a solução de lavagem, como representado na **figura 3.10**.



**Figura 3.10:** Representação do processo de lavagem em papel.

Utilizou-se 50  $\mu$ L de solução de lavagem porque ao contrário da microplaca, estes poços não contêm paredes onde se possa acumular resíduos de reagente não sendo assim necessário adicionar o dobro do volume.

### 3.3.2.2. Registo dos resultados

A leitura dos resultados foi feita visualmente e o registo por fotografia com uma câmara fotográfica. Para garantir um ambiente controlado e igual em todos os ensaios efetuou-se também a aquisição de imagem dentro de um *Quimidoc* – Bio-Rad, Chemidoc<sup>™</sup> XRS (**figura 3.11**).



**Figura 3.11:** *Quimidoc* utilizado para o registo dos resultados em papel, equipamento existente no CEDOC.

### 3.3.3. Otimização do ensaio de ELISA

O ensaio foi otimizado em microplaca e transposto a seguir para o papel de fotocópia e papel de filtro, utilizando os procedimentos descritos em **3.3.1** e **3.3.2**, respetivamente. As variáveis submetidas a otimização foram as seguintes:

- a) Solução de revestimento;
- b) Tempo e temperatura de incubação do revestimento;
- c) Tempo e temperatura de incubação da solução de anticorpo;
- d) Concentração da solução de anticorpo;
- e) Tempo de incubação do substrato;
- f) Volume utilizado no ensaio em papel;
- g) Modo de impressão do sensor de papel;
- h) Concentração do tampão de bloqueio.

O protocolo do ensaio foi otimizado para as estas variáveis tendo em consideração a avaliação da sensibilidade analítica. A sensibilidade analítica define-se como o menor valor que o ensaio consegue diferenciar do branco.

### 3.3.4. Avaliação da especificidade

A avaliação da especificidade foi realizado em suporte de papel fotocópia e os resultados duvidosos foram confirmados em microplaca para quantificação espectrofotométrica. As suspensões bacterianas foram testadas em duplicado e em cada ensaio foi utilizado uma suspensão de *L. pneumophila*, com concentração de  $10^9$  UFC/mL, como controlo positivo e PBS como branco

Numa primeira fase a concentração testada foi  $10^9$  UFC/mL, tendo sido testados os agentes bacterianos responsáveis por pneumonia no Homem (**tabela 3.1**).

**Tabela 3.1:** Bactérias responsáveis por pneumonia no Homem utilizadas na avaliação da especificidade.

Gram-positiva	Gram-negativa	Legionella
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>L. micadadei</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>L. longbeachae</i> sg2
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>L.pneumophila</i> sg4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>L.pneumophila</i> sg6
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Burkholderia cepacia</i>	

Numa segunda fase, como o objetivo deste trabalho é a utilização de amostras de urina para pesquisa de Ag de *L. pneumophila* realizou-se também o ensaio de avaliação da especificidade para agentes bacterianos de infeção urinária no Homem (**tabela 3.2**).

**Tabela 3.2:** Bactérias responsáveis por infeção urinária no Homem utilizadas na avaliação da especificidade.

Gram-positiva	Gram-negativa
<i>Enterococcus</i>	<i>Proteus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	

### 3.4. Caracterização por microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

Para obtenção das imagens que permitem a caraterização e análise morfológica dos materiais utilizados na realização deste trabalho foi utilizado o equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB, representado na figura 3.13, utilizando o modo de eletrões secundários, com uma tensão de aceleração de 2,00 kV, abertura de diafragma de 30,00  $\mu$ m e uma distância de trabalho entre a amostra e a coluna de SEM de cerca de 5 mm.



**Figura 3.12:** Equipamento utilizado na Microscopia eletrônica de varrimento existente no CENIMAT/I3N.

### 3.4.1. Protocolo para a preparação de amostras biológicas

No decorrer deste trabalho, foram preparadas e observadas por microscopia eletrônica de varrimento culturas de *L. pneumophila* sg 1 crescidas em meio sólido BCYE.

Previamente, foi necessário a preparação das seguintes soluções:

**- Tampão cacodilato 0,2 M pH 7,4**

2,1403 g Cacodilato de Sódio trihidratado ( $C_2H_6AgNaO_2 \cdot 3H_2O$ );  
50 mL  $H_2O$  (acertar pH).

**- Tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4**

4,28 g Cacodilato de Sódio trihidratado ( $C_2H_6AgNaO_2 \cdot 3H_2O$ );  
200 mL  $H_2O$  (acertar pH).

**- Solução fixadora (glutaraldeído 3%)**

12 mL 25% glutaraldeído;  
38 mL  $H_2O$ ;  
50 mL tampão cacodilato 0,2 M pH 7,4.

O protocolo para a preparação destas amostras é crucial e por isso foi otimizado.

1. Retirar da placa de BCYE metade de uma ansa de 10  $\mu L$  de bactérias e resuspender em 1 mL em solução fixadora (glutaraldeído 3%);
2. Fixar durante 2 horas à temperatura ambiente sem agitação;
3. Centrifugar a 6000 rpm durante 5 minutos, remover o sobrenadante e resuspender em 1 mL de tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4;
4. Repetir o ponto 3 mais duas vezes;
5. Nesta fase, a solução pode ser guardada no frigorífico para o dia seguinte;
6. Lavar uma vez com etanol absoluto 70%, outra com 95% e três vezes com etanol absoluto 100%. Esperar 5 minutos entre cada lavagem e centrifugar a 6000 rpm. (Nota: na segunda lavagem com etanol absoluto 100% colocar 500  $\mu L$  e na última lavagem colocar 100  $\mu L$ );

7. Colocar ± uma gota na bolacha de silício monocristalino e adicionar umas gotas de hexametildissilazano (HDMS) por cima da bolacha (de modo a cobrir toda a superfície) e deixar secar (trabalhar na *hotte*).

8. Metalização da amostra com o equipamento especializado (Quorum, Q150T ES) formando uma camada ultrafina de crómio ou irídio.

Os pontos 2, 3, 6 e 7 foram otimizados: o tempo de fixação passou para 30 minutos sob agitação de 1600 rpm e todas as centrifugações foram reduzidas para 3000 rpm. Após a última lavagem com etanol 100% (ponto 6) efetuou-se uma lavagem com HDMS e colocou-se ± uma gota da amostra resuspendida em HDMS na bolacha de silício monocristalino.

#### **3.4.1.1. Preparação das amostras biológicas em papel**

Preparação do sensor de papel: pipetou-se 50 µL de uma suspensão de *L. pneumophila* de 10<sup>9</sup> UFC/mL em PBS (como descrito em 3.2) sob o sensor de papel e incubou-se a 4° C *overnight* (revestimento do papel).

Numa primeira fase o protocolo utilizado para visualizar as bactérias no sensor de papel foi realizado de acordo com o protocolo descrito em 3.4.1. a diferença esteve na utilização de placas de Petri pequena para mergulhar o sensor de papel nas várias soluções em vez de utilizar os *ependorfs*.

O protocolo teve que ser otimizado e em vez de mergulhar o sensor de papel nas soluções, colocou-se sobre ele 50 µL. Para além disso foi realizada outras pequenas alterações:

- As lavagens com tampão cacodilato 0,1M pH 7,4 foram realizadas do mesmo modo que o processo de lavagem no ensaio de ELISA (como descrito em 3.3.2.1).

- Não foi realizado o ponto 7, o sensor foi apenas colocado num exsiccador sob vácuo durante a noite.

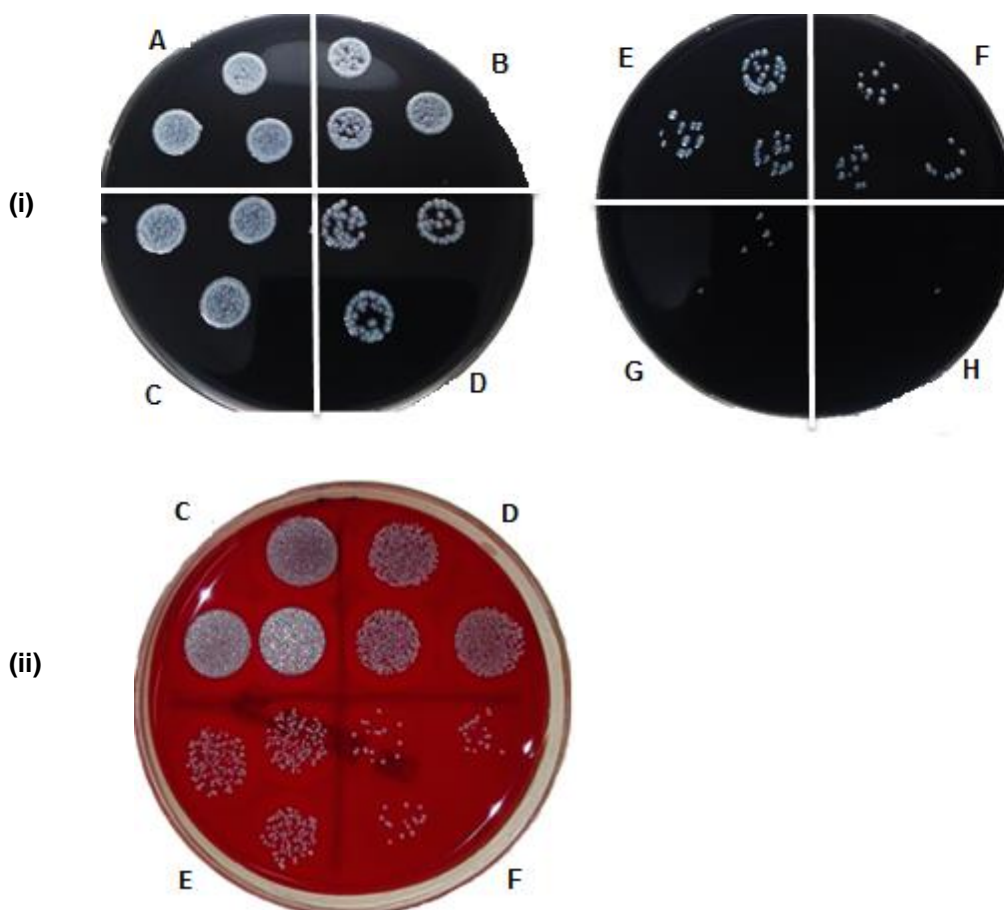
## Capítulo 4

## 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos assim como as considerações das experiências efetuadas ao longo do trabalho. Em primeiro lugar são apresentados os dados obtidos da técnica *Drop-plate* e de seguida do ensaio em ELISA tanto em microplaca como em papel e as otimizações realizadas. Por fim é apresentado os resultados da caracterização morfológica da bactéria *L. pneumophila* em suspensão e revestida no papel.

## 4.1. Técnica Drop-plate

A técnica *Drop-plate* foi utilizada para quantificar a concentração da suspensão de bactérias cuja absorvância é  $1,2 \pm 0,1$  a  $\lambda = 550$  nm. Na figura 4.1 encontra-se o resultado desta técnica para a suspensão de *L. pneumophila* (figura 4.1i) e *Staphylococcus aureus* (figura 4.1ii).



**Figura 4.1:** Suspensões de bactérias inoculadas através da técnica *Drop-plate* e incubada durante 24h a 37°C. (i) Suspensão de *L. pneumophila*; (ii) Suspensão de *Staphylococcus aureus*.

A – Diluição  $10^{-3}$   
 B – Diluição  $10^{-4}$   
 C – Diluição  $10^{-5}$   
 D – Diluição  $10^{-6}$

E – Diluição  $10^{-7}$   
 F – Diluição  $10^{-8}$   
 G – Diluição  $10^{-8}$   
 H – Diluição  $10^{-9}$

O valor de UFC/mL foi obtido a partir da diluição que apresentou 3 a 30 UFC e representa da contagem das três gotas, multiplicando pelo fator de diluição e convertendo para mL. O valor da suspensão de *L. pneumophila* foi de  $1,3 \times 10^9$  UFC/mL e da suspensão de *Staphylococcus aureus*  $0,6 \times 10^9$  UFC/mL.

## 4.2. Otimização do ensaio de ELISA

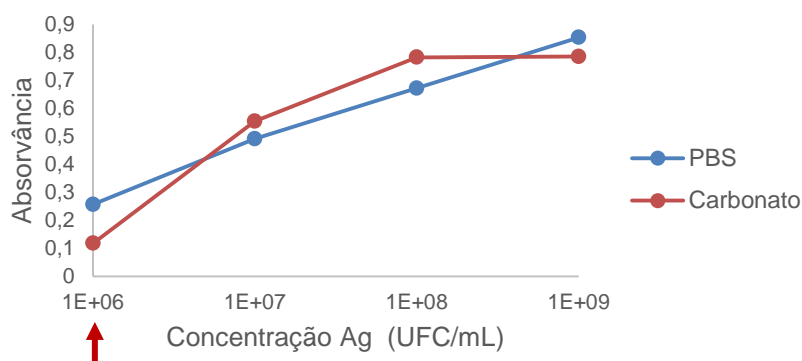
A otimização do ensaio foi realizada em microplaca para obter resultados quantitativos (valores de absorvância) dos diferentes protocolos testados garantindo assim uma comparação mais rigorosa.

O objetivo desta etapa é reduzir o tempo do ensaio, diminuir os custos associados com equipamento e reagente e melhorar a sensibilidade.

### 4.2.1. Solução de revestimento

No ensaio de ELISA em microplaca para sensibilização do suporte foram testados dois tampões de revestimento, a solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e o tampão carbonato 0,6M pH 9,6. A primeira por ser uma solução muito utilizada em laboratório e a segunda por ser uma solução alcalina que confere cargas negativas. Estas cargas podem melhorar a adsorção do Ag à microplaca através de interações eletrostáticas, visto que o poliestireno utilizado para confeccionar as microplacas tem cargas positivas.

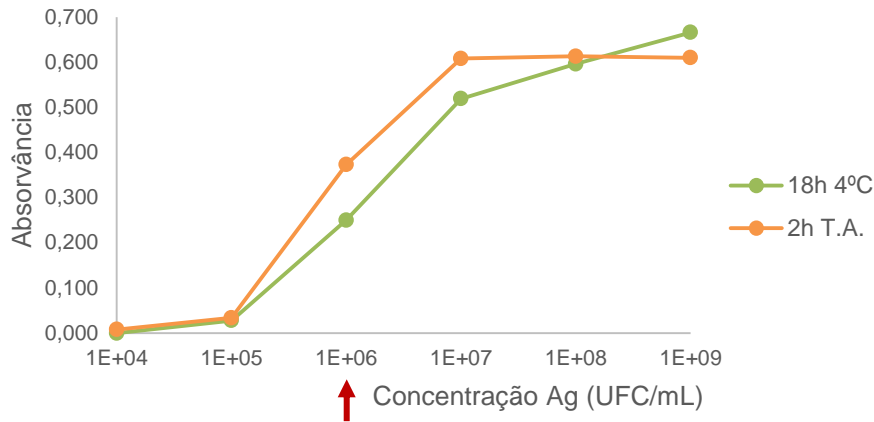
Na **figura 4.2** apresenta-se os resultados obtidos com os dois tampões de revestimento, após a técnica completa de ELISA. Com este ensaio verifica-se que a utilização de uma solução tamponada alcalina não melhora a adsorção do Ag dado que a sensibilidade do ensaio não é alterada e apresenta valores de absorvância inferiores aos obtidos com a solução de PBS pH 7,4. Este resultado pode ser explicado pelo facto de o pH neutro (próximo de 7) ser o pH ótimo da enzima HRP, ou seja, é o valor de pH para o qual a atividade enzimática é máxima [40].



**Figura 4.2:** Leitura de absorvância a 415 nm de dois ensaios utilizando tampões de revestimento diferentes com concentração crescente de Ag. A seta vermelha indica a sensibilidade do ensaio.

A incubação da solução de Ag foi realizada numa face inicial durante a noite (18 horas) e a 4°C para garantir a integridade das bactérias.

Para diminuir o tempo desta etapa e evitar a utilização de equipamentos (frigorífico), reduziu-se o tempo de incubação para 2 hora à temperatura ambiente (T.A.). Na **figura 4.3** apresenta-se os resultados obtidos com os dois protocolos de revestimento.

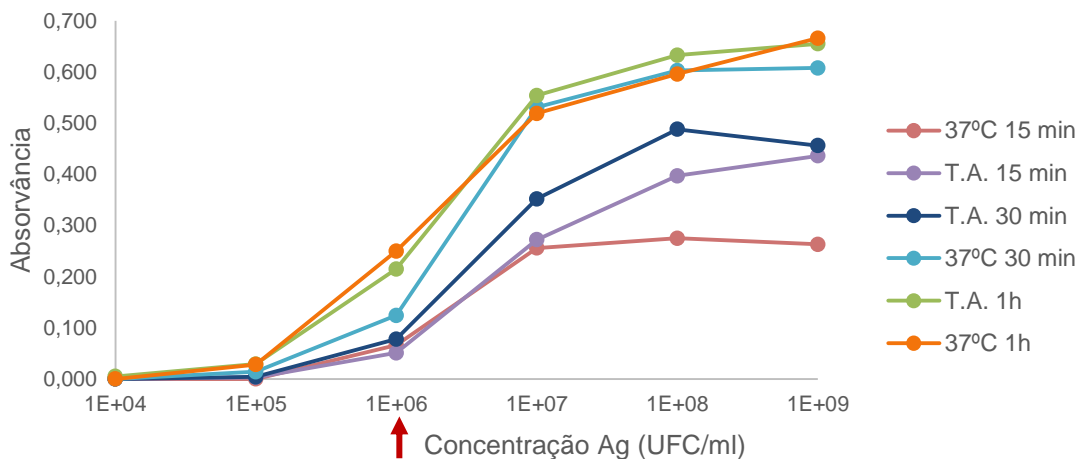


**Figura 4.3:** Leitura de absorvância a 415 nm de dois ensaios utilizando dois protocolos de revestimento diferentes com concentrações crescentes de Ag. A seta vermelha indica a sensibilidade do ensaio.

Através da **figura 4.3** podemos verificar que a incubação durante 2 horas à temperatura ambiente mantém a sensibilidade do ensaio ( $10^6$  UFC/mL) mas aumenta o valor de absorvância. Verifica-se que é possível diminuir o tempo do ensaio e excluir a utilização do frigorífico poupando assim, energia. Este protocolo é mais económico, simples e amigo do ambiente.

#### 4.2.2. Solução de anticorpo

A reação com o anticorpo foi realizada utilizando diferentes tempos de incubação (15 min, 30 min e 1h) e diferentes temperaturas (37°C e T.A.). Os resultados obtidos apresentam-se na **figura 4.4**.



**Figura 4.4:** Leitura de absorvância a 415 nm para os diferentes tempos e temperaturas de incubação da solução de anticorpo com concentração crescentes de Ag. A seta vermelha indica a sensibilidade do ensaio.

Através da análise da **figura 4.4** podemos constatar que se obteve maior sensibilidade e valor de absorvância no valor de concentração mínima que o ensaio consegue detectar ( $10^6$  UFC/mL) nas incubações com 1 hora a 37°C ou à T.A.

Visto que o objetivo deste teste é ser simples e livre de equipamentos para que possa ser usado em situações de *point-of-care* em regiões desfavorecidas, o protocolo mais adequado a estas condições é a incubação à T.A.

Para além disso, foram testadas várias concentrações da solução de anticorpo. Utilizou-se concentrações dentro do intervalo recomendado para os ensaios de ELISA, ou seja, entre 0,25 e 2 µg/mL.

O objetivo deste passo é determinar a concentração mínima de anticorpo que mantém a sensibilidade do ensaio.

Numa primeira fase testou-se diferentes concentrações de anticorpo utilizando a concentração de Ag mais elevada ( $10^9$  UFC/ml).

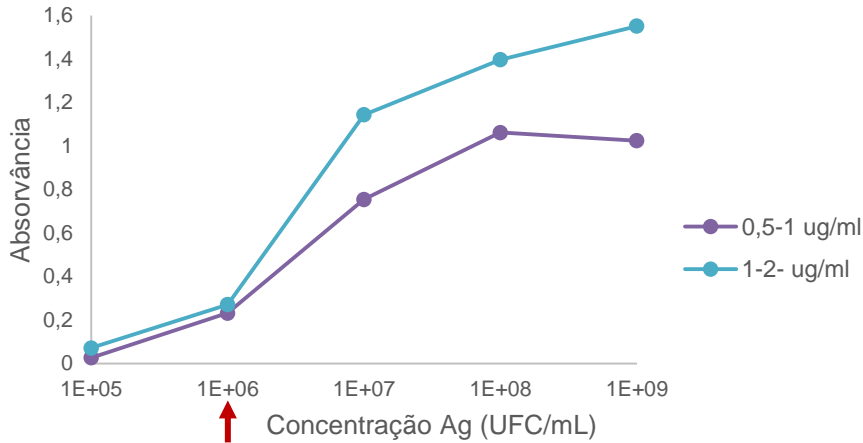
Dado que nas indicações do produto a concentração inicial do anticorpo está compreendida entre 1 a 2 mg/mL, na **tabela 4.1** apresenta-se as concentrações testadas também em intervalo.

**Tabela 4.1:** *Leitura de absorvância a 415 nm das diferentes concentrações de anticorpo testadas com Ag a  $10^9$  UFC/ml. A negrito encontra-se apresentada a concentração de anticorpo inicialmente utilizada.*

Concentração de anticorpo (µg/mL)	[Ag] = $10^9$ UFC/mL (Absorvância)
0,25-0,5	0,61
0,5-1	1,02
<b>1-2</b>	<b>1,40</b>

Analisando estes valores verifica-se que, em relação à concentração inicialmente utilizada (1 a 2 µg/mL) a concentração de 0,25-0,5 µg/mL apresenta uma diminuição acentuada, para mais de metade, indiciando uma perda de sensibilidade do ensaio, pelo que foi excluída.

Para a concentração de anticorpo 0,5 a 1 µg/mL testou-se a sensibilidade utilizando diferentes concentrações de Ag e comparou-se com a concentração de 1 a 2 µg/mL (**figura 4.5**).

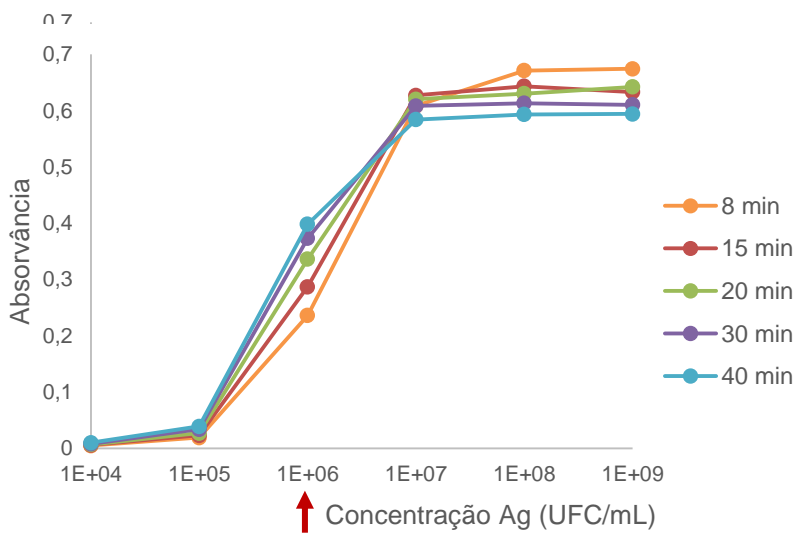


**Figura 4.5:** Leitura de absorvância a 415 nm de duas concentrações de anticorpo com concentrações crescentes de Ag. A seta vermelha indica a sensibilidade do ensaio.

Através da **figura 4.5** é possível constatar que o valor da sensibilidade e da absorvância se mantêm. Por isso, esta diminuição da concentração da solução de anticorpo não interfere nos resultados e permite reduzir os custos do ensaio.

#### 4.2.3. Solução de substrato

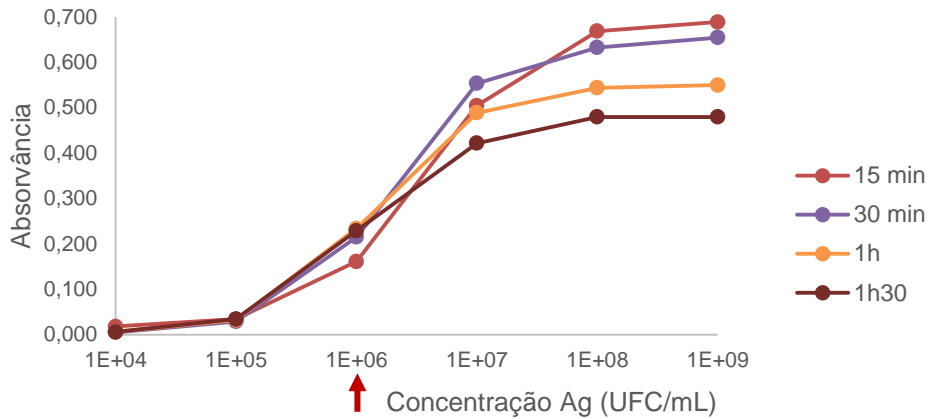
O tempo de incubação com o substrato tem que ser o suficiente para garantir que não haja falsos negativos por reação incompleta, isto é, não ser suficiente para o desenvolvimento da cor. Assim, para a leitura da absorvância foram testados vários tempos de incubação (**figuras 4.6, 4.7 e 4.8**).



**Figura 4.6:** Leitura de absorvância a 415 nm para diferentes tempos de incubação da solução de substrato com concentrações crescentes de Ag. A seta vermelha indica a sensibilidade do ensaio.

Na figura 4.6 verifica-se que absorvância para a concentração de  $10^6$  UFC/mL apresenta valores mais elevados quanto maior for o tempo de incubação com o substrato, o mesmo não acontece para concentrações superiores a esse valor.

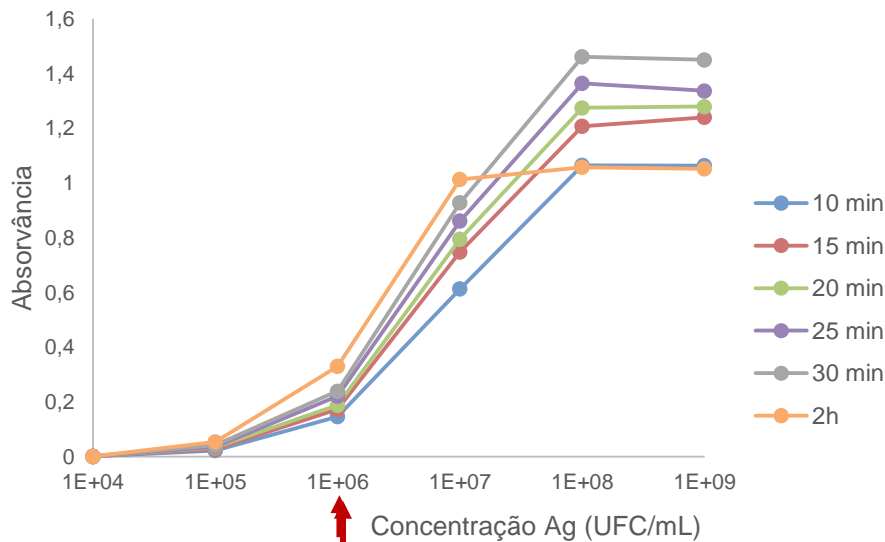
Para esclarecer essa situação realizou-se um ensaio em que se testou tempos de incubação com o substrato, mais baixos (15 e 30 minutos) e mais altos (1h e 1h30) (**figura 4.7**).



**Figura 4.7:** Leitura de absorvância a 415 nm para diferentes tempos de incubação da solução de substrato com concentrações crescentes de Ag. A seta vermelha indica a sensibilidade do ensaio.

Com os resultados obtidos na **figura 4.7** podemos verificar que o tempo de incubação de 30 minutos é o que apresenta melhores resultados. A sensibilidade mantém-se e o valor da absorvância é igual ao dos tempos mais altos de incubação (1h e 1h30).

Para confirmar estes resultados realizou-se um ensaio em que a leitura das absorvâncias foi efetuada de 5 em 5 minutos, no intervalo entre os 10 e os 30 minutos de incubação, e com 2 horas (**figura 4.8**).



**Figura 4.8:** Leitura de absorvância a 415 nm para diferentes tempos de incubação da solução de substrato com concentrações crescentes de Ag. A seta vermelha indica a sensibilidade do ensaio.

Os resultados obtidos mostram que a leitura às 2 horas é a que apresenta valores de absorvância mais elevados nas concentrações de  $10^6$  e  $10^7$  UFC/mL, no entanto, nas concentrações superiores tem valores mais baixos.

Analisando os valores de absorvância em função das concentrações de Ag verifica-se que a leitura aos 30 minutos é a que apresenta melhor *performance* pois, a concentrações elevadas obtêm-se valores de absorvância maiores. Por outro lado, nas concentrações mais baixas a

variação do valor da absorvância que se verifica entre o tempo de incubação de 30 minutos e o de 2 horas não é significativa.

Com os diferentes ensaios realizados pode-se afirmar que o tempo de incubação mais adequado para a solução de substrato é de 30 minutos.

#### 4.2.4. Protocolo otimizado em microplaca

Tendo em conta as variações testadas o protocolo foi otimizado para as condições presentes na tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Condições otimizadas das variáveis testadas.

Etapa	Reagente	Concentração	Tempo / temperatura de incubação
<b>Revestimento</b>	PBS	(1x)	2 horas / T.A.
<b>Anticorpo</b>	IgG anti- <i>L.pneumophila</i>	0,5-1 µg/mL	1 hora / T.A.
<b>Substrato</b>	ABTS	–	30 minutos / T.A.

No total, o protocolo otimizado tem a duração de 4 horas e 30 minutos e todas as etapas são realizadas à T.A. dispensando assim a utilização de equipamentos de incubação.

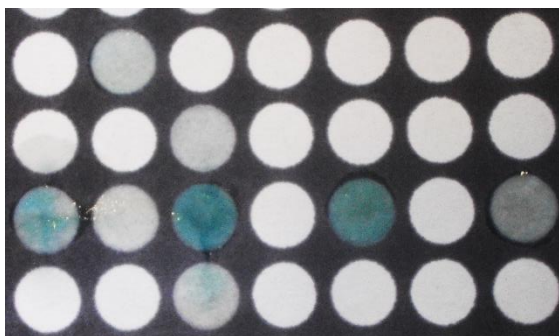
### 4.3. Ensaio de ELISA em papel

O ensaio de ELISA em papel foi realizado com o protocolo otimizado em microplaca (descrito em 4.2.5) e posteriormente efetuado pequenas alterações.

O registo dos resultados no sensor de papel é efetuado por fotografia e a análise por comparação com o branco, uma vez que se pretende desenvolver um sensor que permita uma análise rápida e simples.

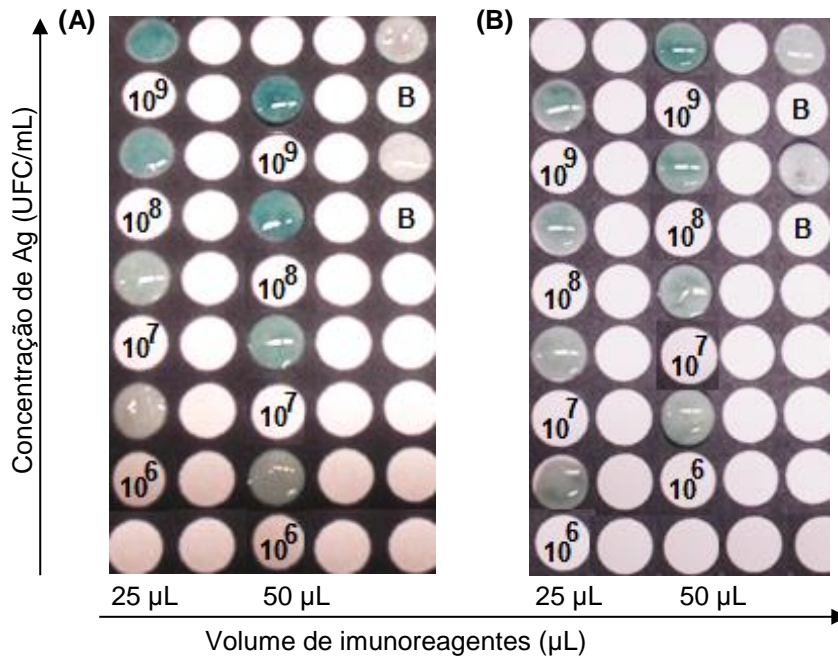
#### 4.3.1. Volume de imunoreagentes

Na primeira fase do ensaio foi usado os mesmos volumes utilizados na ELISA convencional mas como se pode ver pela **figura 4.9**, a barreira hidrofóbica é quebrada e o líquido acaba por sair do espaço confinado à realização do ensaio.



**Figura 4.9:** Ensaios de ELISA realizados em papel de filtro utilizando os volumes do ensaio de ELISA em microplaca.

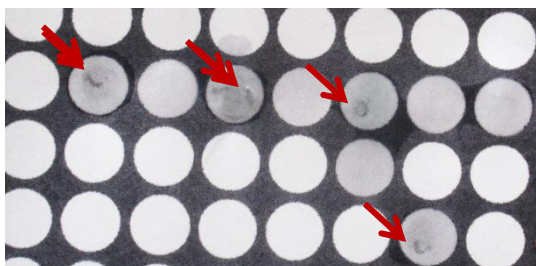
Para contornar este problema testou-se outros volumes, reduziu-se para metade (50  $\mu\text{L}$ ) e para um quarto (25  $\mu\text{L}$ ). Os resultados desta alteração são apresentados na **figura 4.10A** (papel de filtro) e na **figura 4.10B** (papel de fotocópia).



**Figura 4.10:** Ensaios de ELISA realizados (A) no papel de filtro; (B) no papel de fotocópia.

Verifica-se que a utilização de um volume de 25  $\mu\text{L}$  diminui a sensibilidade, pelo que o volume mais adequado para o ensaio é 50  $\mu\text{L}$ . Também se pode constatar que a utilização deste volume (50  $\mu\text{L}$ ), principalmente no papel de fotocópia (**figura 4.10B**), garante um melhor revestimento da superfície total do poço. Esta diminuição não é possível de ser realizada em placa de poliestireno pois, este volume não cobre a totalidade da superfície do poço,

Outro problema detetado foi que a utilização das micropipetas para retirar o líquido das diferentes soluções usadas durante o ensaio não revela ser o método mais adequado, dado que as pontas danificam o papel (**figura 4.11**). Por isso, otimizou-se o protocolo de lavagem para o descrito em 3.3.2.1 que se baseia na utilização de papel absorvente para retirar as soluções.

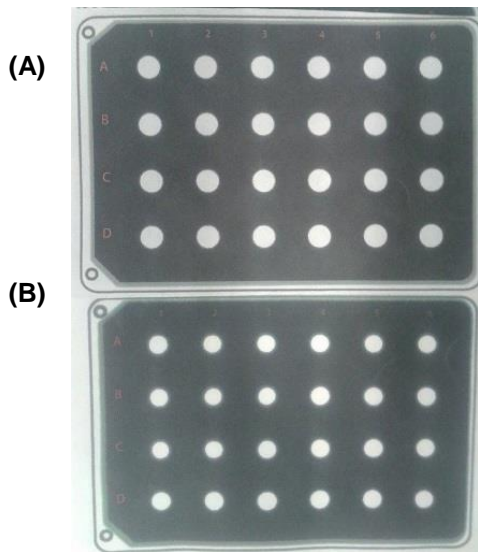


**Figura 4.11:** Sensor de papel de fotocópia danificado pela utilização da micropipeta para retirar o líquido das diferentes soluções. As setas a vermelho assinalam as zonas de rutura do papel.

#### 4.3.2. Modo de impressão do sensor

O modo de impressão da cera no papel foi otimizado de maneira a que fosse depositado o máximo de cera possível sem interferir com o tamanho dos poços. No caso papel de filtro o

modo de impressão não pôde ser o mais elevado (*Photo*) pois quando a cera era difundida o tamanho dos poços diminuía, como podemos verificar pela **figura 4.12**.

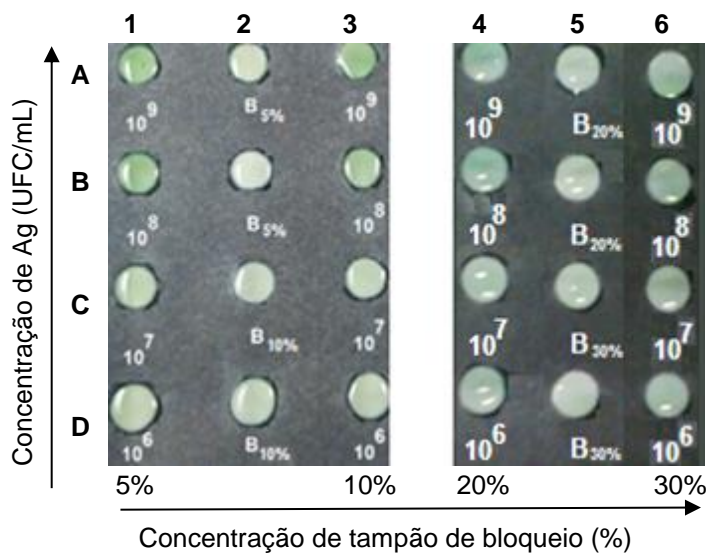


**Figura 4.12:** Sensor de papel após a difusão da cera. (A) Impressão do design em modo Enhancer; (B) Impressão do design em modo Photo.

Este resultado deve-se ao facto de o papel de filtro absorver mais a cera pois, é menos hidrofóbico que o papel de fotocópia.

#### 4.3.3. Tampão de bloqueio

De maneira a melhorar o branco no sensor de papel para que este seja totalmente incolor foi otimizado o processo de lavagem (descrito em 3.3.2.1) e testado concentrações de tampão de bloqueio mais elevadas.



**Figura 4.13:** Ensaio de ELISA no papel de fotocópia utilizando as concentrações de bloqueio de 5, 10, 20 e 30% de Molico.

Na **figura 4.13** na linha A, B, C e D encontram-se respetivamente as concentrações de Ag de 10<sup>9</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>5</sup> (UFC/mL) sendo que na fila 1 corresponde ao ensaio realizado com a tampão de bloqueio de 5% de Molico, na fila 3 de 10%, na fila 4 de 20% e por fim na fila 6 de 30% de Molico.

Verifica-se que à medida que se aumenta a concentração de tampão de bloqueio diminui-se a sensibilidade. Os brancos permanecem praticamente com a mesma coloração em todas as concentrações, o que revela que o processo de lavagem foi otimizado. Sendo assim, optou-se pelo tampão de bloqueio que revela maior sensibilidade (solução com 5% de Mólico).

#### 4.3.4. Protocolo otimizado em papel (papel fotocópia e papel de filtro)

Tendo em conta as variações testadas o protocolo foi otimizado para as condições presentes na tabela 4.3.

**Tabela 4.3:** Condições otimizadas das variáveis testadas.

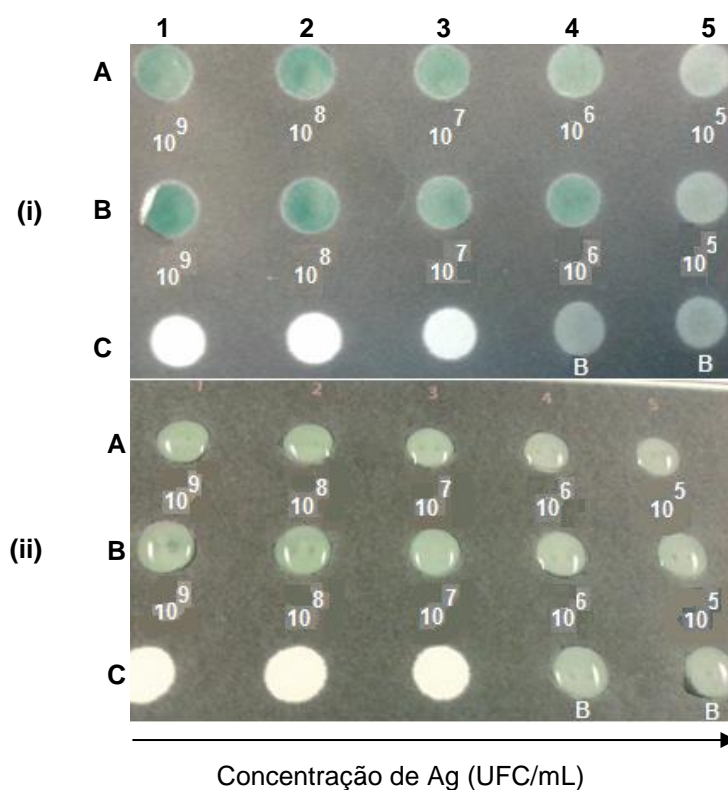
Etapa	Reagente	Concentração	Tempo / temperatura de incubação
Revestimento	PBS	(1x)	2 horas / T.A.
Bloqueio	Mólico	5%	1 hora / T.A.
Anticorpo	IgG anti- <i>L.pneumophila</i>	0,5-1 µg/mL	1 hora / T.A.
Substrato	ABTS	–	30 minutos / T.A.

No total, o protocolo otimizado tem a duração de 4 horas e 30 minutos e todas as etapas são realizadas à T.A. dispensando assim a utilização de equipamentos de incubação.

#### 4.4. Estudo da sensibilidade analítica

O estudo da sensibilidade analítica foi executado com as otimizações ao protocolo descrito em 4.3.4

Como referido em 4.2 a sensibilidade do ensaio em microplaca é de  $10^6$  UFC/mL. Na **figura 4.14** são apresentados os resultados obtidos para o papel fotocópia (**figura 4.14i**) papel de filtro (**figura 4.14ii**).



**Figura 4.14:** Estudo da sensibilidade (i) em suporte de papel de filtro; (ii) em papel de fotocópia.

Nas filas 1, 2, 3, 4 e 5 encontram-se, respetivamente, as concentrações de Ag  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  (UFC/mL) e nos poços 4C e 5C os brancos. Verifica-se que a sensibilidade do ensaio em papel de filtro é igual à da microplaca,  $10^6$  UFC/mL, mas para o papel fotocópia o resultado é duvidoso, pelo que se definiu como limite de deteção o valor de  $10^7$  UFC/mL. Este valor apresenta uma diminuição de um log de 10 em relação à microplaca de poliestireno e ao papel de filtro. Esta diminuição pode dever-se ao facto do papel fotocópia ter uma superfície mais densa, com menos espaços entre as fibras de celulose, ou seja, menos porosa, levando a uma menor adesão do Ag.

#### 4.5. Avaliação da especificidade

No ensaio de avaliação da especificidade realizado no sensor de papel fotocópia foi utilizado o protocolo de ELISA otimizado (descrito em 4.3.4). Foi realizado também o controlo positivo que consiste na realização do ensaio com a bactéria *L.pneumophila* sg 1. Os resultados obtidos com as bactérias responsáveis por quadros de pneumonia no Homem estão apresentados na **tabela 4.4**.

**Tabela 4.4:** Resultado da avaliação da especificidade realizada com as bactérias responsáveis por pneumonia no Homem.

Bactérias responsáveis por pneumonia no Homem	Resultados
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Negativo
<i>Burkholderia cepacia</i>	Negativo
<i>Haemophilus influenzae</i>	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
<i>L. longbeachae</i> sg2	Negativo
<i>L. micadadei</i>	Negativo
<i>L.pneumophila</i> sg4	Negativo
<i>L.pneumophila</i> sg6	Negativo
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>Positivo</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<b>Positivo</b>

Na **tabela 4.5** estão apresentados os resultados obtidos com as bactérias responsáveis por infeção urinária no Homem.

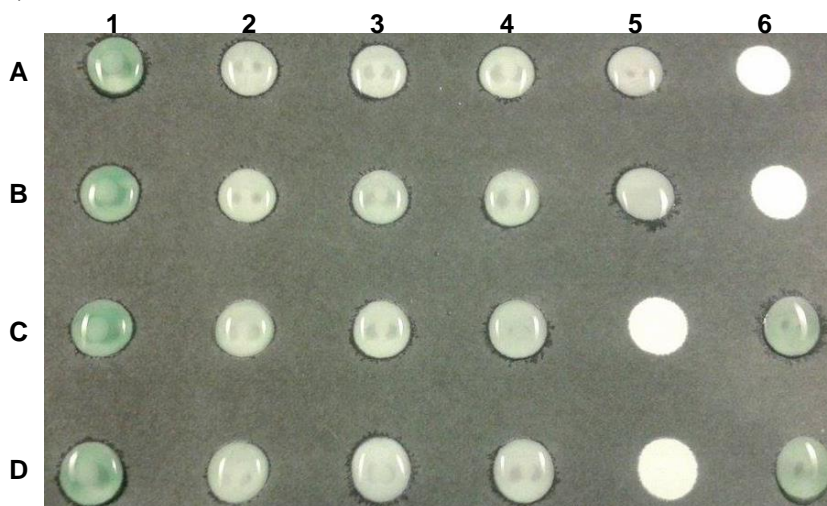
**Tabela 4.5:** Resultado da avaliação da especificidade realizada com as bactérias responsáveis por infecção urinária no Homem.

Bactérias responsáveis por infecção urinária no Homem	Resultados
<i>Enterococcus</i>	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	Negativo
<i>Proteus</i>	Negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo
<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	Negativo
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negativo

Analisando os resultados verifica-se que se obteve resultados negativos para todos os agentes testados excepto para o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus pyogenes*.

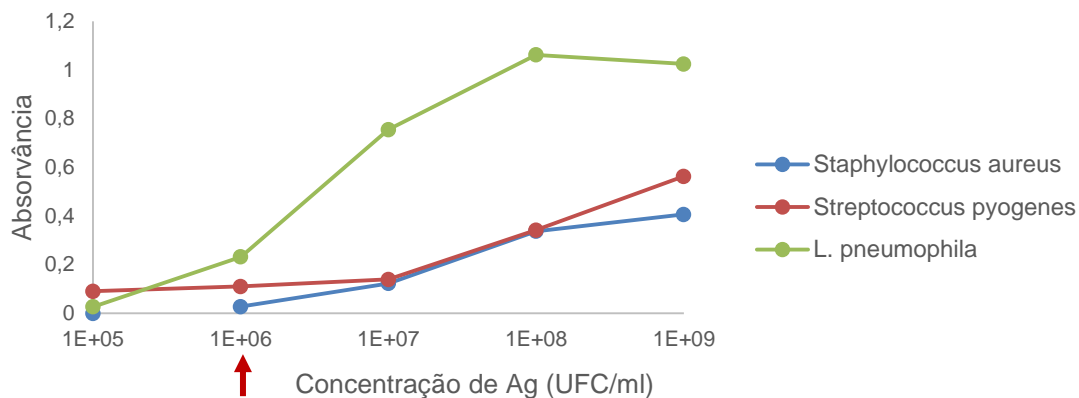
Como se pode constatar na **tabela 4.4** e **4.5** os resultados para *L. pneumophila* sg 4 e 6 são negativos. Apesar do anticorpo utilizado ser policlonal, verifica-se que não deteta outros serogrupos para além do sg1. Esta poderá ser uma possível explicação para, também, os testes comerciais utilizados no diagnóstico da DL só detectarem o sg1.

Na **figura 4.15** mostra-se um exemplo da avaliação da especificidade realizado no sensor de papel fotocópia, em que na fila 6C e 6D está o controlo positivo e na fila 1 estão as bactérias que deram reacção positiva (**1A** e **1B** - *Staphylococcus aureus* e **1C** e **1D** - *Streptococcus pyogenes*).



**Figura 4.15:** Exemplo de uma avaliação da especificidade realizado com o sensor de papel fotocópia.

Dado que se verificam reacções cruzadas com dois dos agentes testados avaliou-se a sensibilidade destas reacções em microplaca. Os resultados obtidos são apresentados na **figura 4.16**.



**Figura 4.16:** Leitura de absorvância a 415 nm de três ensaios utilizando o revestimento com diferentes suspensões bacterianas e com concentrações crescentes de Ag. A seta vermelha indica a sensibilidade do ensaio.

Podemos verificar que apesar das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* terem um resultado positivo no ensaio, apresentam menor sensibilidade ( $10^7$  UFC/mL) que a *L. pneumophila* ( $10^6$  UFC/mL) e menor valor de absorvância.

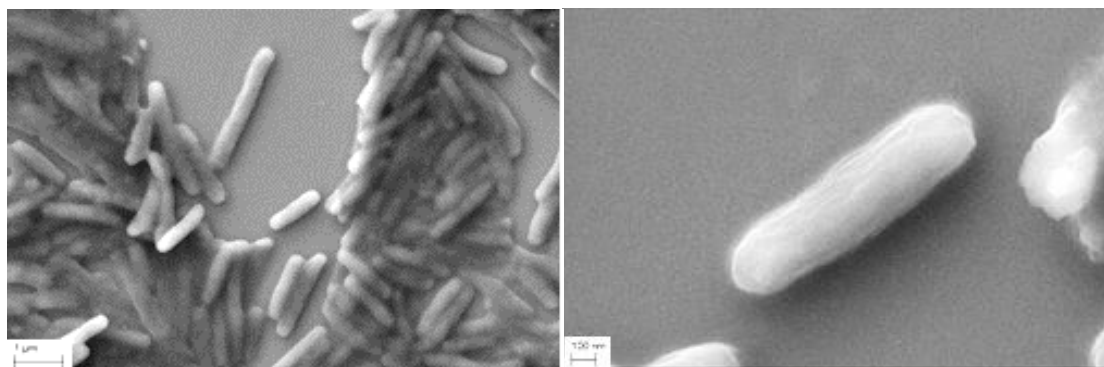
O facto de estas bactérias reagirem positivamente neste ensaio revela que tem afinidade para o anticorpo utilizado. Este facto já foi referido na literatura, e está associado com a presença da proteína A, no caso da bactéria *Staphylococcus aureus* e proteína do tipo M, no caso da bactéria *Streptococcus pyogenes* [51]. Estas proteínas encontram-se na parede celular das bactérias respetivas e tem a função de se ligar aos anticorpos, impedindo-os de atuar.

#### 4.6. Caracterização por microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

Utilizou-se a microscopia eletrónica de varrimento (SEM) para visualizar a morfologia da bactéria *L. pneumophila* em suspensão e a sua adesão ao papel.

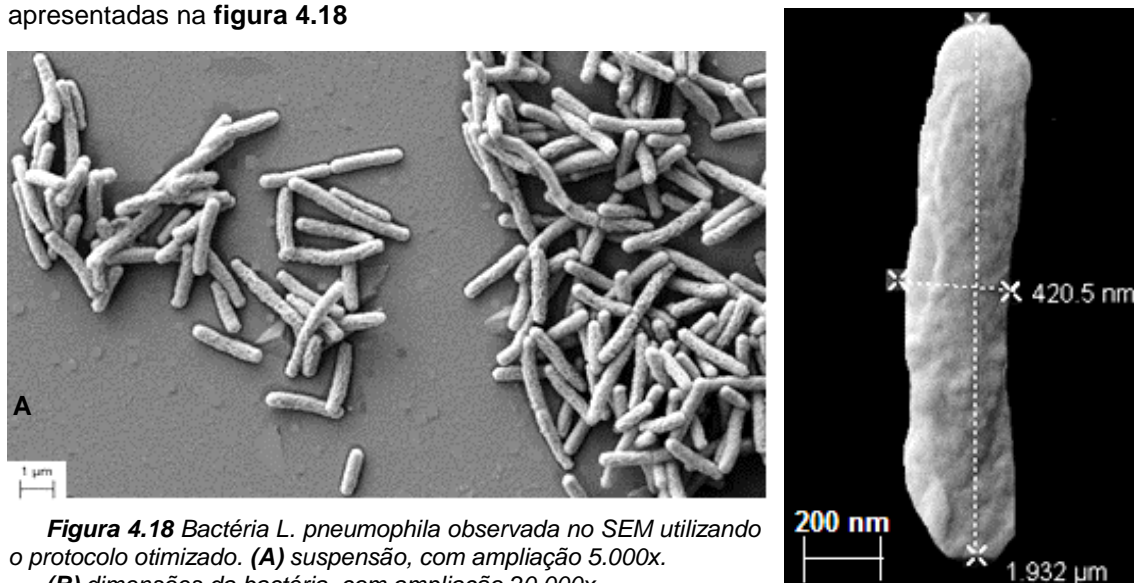
##### 4.6.1. Suspensão de *L. pneumophila*

Para obtenção das imagens que permitem a análise morfológica da bactéria foi necessário otimizar o protocolo de preparação das amostras, a **figura 4.17** mostra as imagens referentes ao primeiro protocolo utilizado.



**Figura 4.17:** Bactéria *L. pneumophila* observada no SEM, com ampliação 10.000x (esquerda) e ampliação 50.000x (direita).

Com este protocolo verifica-se a presença de uma película de resíduos e as bactérias encontram-se aglomeradas e pouco nítidas. Por isso, o protocolo foi otimizado (fixação com solução de glutaraldeído sobre agitação e resuspensão em HDMS) tendo-se obtido as imagens apresentadas na **figura 4.18**

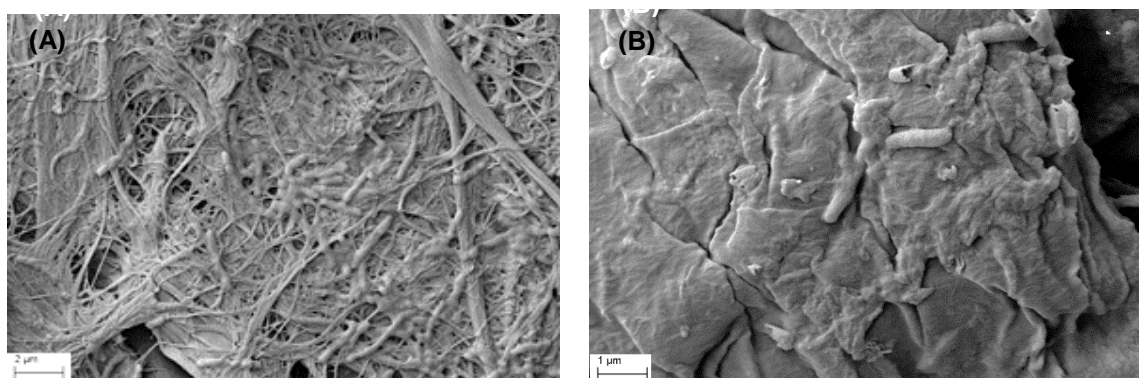


**Figura 4.18** Bactéria *L. pneumophila* observada no SEM utilizando o protocolo otimizado. (A) suspensão, com ampliação 5.000x. (B) dimensões da bactéria, com ampliação 20.000x.

Verifica-se que com o protocolo otimizado se consegue obter imagens mais nítidas, sem vestígios de resíduos. As bactérias apresentam uma estrutura em forma de bacilos com aproximadamente 421 nm de largura e 2 µm de comprimento (**figura 4.18B**).

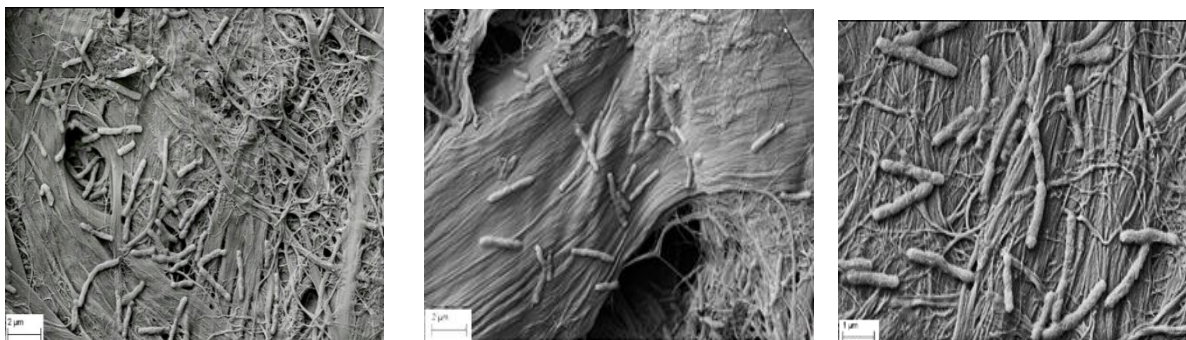
#### 4.6.2. Sensor de papel revestido com *L. pneumophila*

O protocolo utilizado para visualizar o sensor de papel revestido com *L. pneumophila* foi o descrito 3.4.1.1, tendo o sensor sido mergulhado nas soluções. Na **figura 4.19** apresenta-se os resultados obtidos com este protocolo.

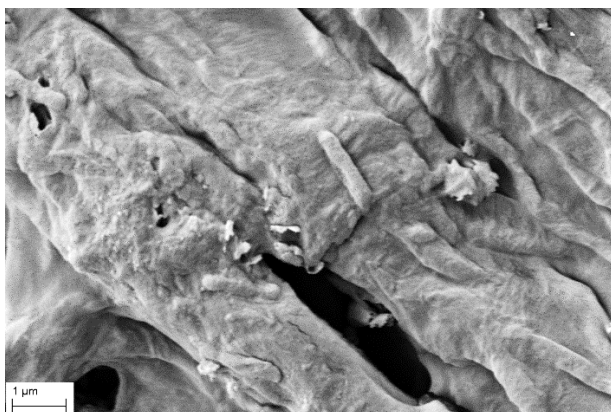


**Figura 4.19:** Sensor de papel revestido com *L. pneumophila* observado no SEM (A) papel de filtro, com ampliação de 5.000x (B) papel de fotocópia, com ampliação 10.000x.

Como se pode constatar não é fácil distinguir as bactérias das fibras do papel e a sua morfologia não foi conservada, verificando-se o colapso da estrutura bacteriana. Desta forma, foi necessário otimizar o protocolo, o resultado desta otimização encontra-se na **figura 4.20** (papel de filtro) e **4.21** (papel de fotocópia).



**Figura 4.20:** Sensor de papel de filtro revestido com *L. pneumophila*, observação no SEM com ampliação 5.000x (direita e meio) e ampliação 10.000x (esquerda).



**Figura 4.21:** Sensor de papel de fotocópia revestido com *L. pneumophila*, observação no SEM, com ampliação 10.000x.

A otimização do protocolo possibilitou uma adequada visualização das bactérias no papel de filtro, verificando-se a presença de um elevado número de bactérias neste sensor. Isto poder ser a explicação para o facto de se ter obtido valores de sensibilidade iguais entre o sensor de papel de filtro e a microplaca de poliestireno.

O mesmo não se verificar no papel de fotocópia em que a alteração do protocolo não melhorou a resolução da imagem, continuando as bactérias colapsadas.

Da análise comparativa das **figuras 4.20 e 4.21** verifica-se que no papel fotocópia há menor concentração de bactérias, podendo esta ser a explicação para no estudo da sensibilidade se ter obtido uma sensibilidade inferior ao do papel de filtro.

O facto da superfície do papel fotocópia ser menos porosa que a do papel de filtro, como podemos ver pela **figura 4.21**, pode influenciar na adesão das bactérias ao papel e por isso estas serem menos aderidas.

#### 4.7. Análise de custos do suporte de papel desenvolvido

Por último, foi realizado a análise de custos do suporte de papel desenvolvido - sensor com 24 poços e uma dimensão externa de 85,4 x 127,6 mm, de maneira a realizar uma comparação com a microplaca de poliestireno. Nesta análise não foram tidos em consideração os gastos de eletricidade dos aparelhos utilizados para a produção sensor (impressora de cera e placa térmica).

Na **tabela 4.6 e 4.7** são apresentados os custos associados ao fabrico em papel de fotocópia e de filtro, respetivamente.

**Tabela 4.6:** *Análise de custos do suporte de papel de fotocópia.*

<b>Material</b>	<b>Quantidade (mm)</b>	<b>Custo (€/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Custo/Sensor (€)</b>
<b>Papel 300 % Iberpapel</b>	85,4 x 127,6	0,13	$1,4 \times 10^{-3}$
<b>Cera</b>	85,4 x 127,6	0,28	$3,1 \times 10^{-3}$
<b>Total</b>			<b><math>4,5 \times 10^{-3}</math></b>

**Tabela 4.7:** *Análise de custos do suporte de papel de filtro.*

<b>Material</b>	<b>Quantidade (mm)</b>	<b>Custo (€/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Custo/Sensor (€)</b>
<b>Papel Whatman nº1</b>	85,4 x 127,6	5,99€/m <sup>2</sup>	$6,5 \times 10^{-2}$
<b>Cera</b>	85,4 x 127,6	0,28 €/m <sup>2</sup>	$3,1 \times 10^{-3}$
<b>Total</b>			<b><math>6,6 \times 10^{-2}</math></b>

O suporte em papel de fotocópia tem um custo aproximadamente de 0,5 cêntimos por sensor, enquanto que o papel de filtro é próximo de 66 cêntimos. O suporte de microplaca de poliestireno com as mesmas dimensões tem um custo de aproximadamente 79 cêntimos. Verifica-se assim, que os suportes em papel são mais económicos, sendo o sensor fotocópia substancialmente mais económico.

## Capítulo 5

### 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

No âmbito deste trabalho utilizou-se o papel como substituto das microplacas de poliestireno usadas para os ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA para a deteção colorimétrica da bactéria *L. pneumophila*, através da tecnologia *Lab-on-Paper*. Com esta substituição pretendeu-se desenvolver um teste mais amigável do ambiente (papel/biodegradável *versus* microplaca/poluentes) e que permitisse uma redução dos custos.

Através das otimizações efetuadas elaborou-se um protocolo que permitiu diminuir o volume dos reagentes e a concentração da solução de anticorpo para metade, reduzindo assim o custo do teste. Em relação ao tempo do ensaio conseguiu-se diminuir o tempo de revestimento para 2 horas tornando possível a realização do teste no próprio dia (duração total do ensaio= 4h30).

Uma vantagem deste sensor em papel é a não utilização de equipamentos para a incubação e leitura dos resultados, tornando assim o teste ainda mais económico, simples e ecológico, por não recorrer ao consumo de energia.

Através dos resultados obtidos no papel foi possível concluir que o papel é um bom substituto das microplacas de poliestireno.

O papel que mostrou maior sensibilidade foi o papel de filtro ( $10^6$  UFC/mL), sendo que o papel fotocópia tem uma diferença de um log de 10. Num estudo realizado por Briand e col. em 2015 verificou-se que dois em seis dos kits comerciais testados tiveram reação negativa para concentrações de  $10^5$  UFC/mL, à semelhança do teste desenvolvido neste trabalho, e que os restantes tinham uma sensibilidade de  $10^4$  UCF/mL<sup>[52]</sup>. Estes resultados indicam que o sensor em papel de filtro tem limites de deteção próximos dos kits comerciais utilizados para o diagnóstico rápido da DL. No entanto, como o papel de fotocópia é aproximadamente 158 vezes mais económico que a placa de poliestireno e nas concentrações elevadas de Ag tem a mesma *performance*, é vantajoso a sua utilização nestas situações.

Para implementar este sensor em termos de diagnóstico é aconselhável realizar um revestimento com um anticorpo de captura específico para o antigénio urinário, de preferência monoclonal, de forma a melhorar a especificidade e sensibilidade. Este tipo de ELISA sanduíche seria utilizado para amostras clínicas após a fase de revestimento e o passo de bloqueio e teria um tempo total de execução de, aproximadamente, 2 hora e 30 minutos: 1 hora para a ligação do anticorpo de captura ao Ag presente na amostra, 1 hora para a ligação dos anticorpos de deteção e 30 minutos para a reação do substrato (desenvolvimento de cor).

O teste beneficiaria com o encapsulamento com cera na parte de trás do sensor (etapa não realizada durante o presente trabalho), de maneira a poder ser manuseado sem que haja necessidade de estar suspenso em cima de um suporte.

Outra otimização que poderia ser testada seria o aumento apenas do volume de amostra, dado que a recolha da amostra de urina, utilizada nos testes rápidos de diagnóstico da DL (antigenúria), não requer um procedimento invasivo e é fácil de obter.

Devido à crescente preocupação na manutenção e inspeção dos sistemas de refrigeração dos locais públicos, para evitar o aparecimento de casos de DL ou o pagamento de coimas associadas a valores elevados de *Legionella*, que podem ir de 2 500,00 a 44 890,00€ (por incumprimento do artigo n.º48 do Decreto-Lei n.º118/2013, de 20 de agosto) é de extrema importância a implementação de uma fiscalização periódica e que produza resultados rápidos. Neste contexto, seria importante testar este sensor com amostras de água, com a finalidade de aferir a possibilidade da sua utilização na investigação ambiental por empresas de manutenção ou fiscalização. O sensor desenvolvido neste trabalho foi um ensaio de ELISA direta para a pesquisa de Ag da parede celular da bactéria *L. pneumophila* o que possibilita a utilização na identificação da bactéria em amostras de água, previamente concentradas. Este sensor por ser simples, económico, de fácil utilização, livre de equipamento é ideal para a utilização *in situ*.

Atualmente as análises de água são realizadas unicamente por técnicas de PCR e cultura em meio sólido. Estas técnicas, ao contrário do sensor de papel, são laboriosas, economicamente mais onerosas (reagentes e equipamento) e não são possíveis de ser realizadas por pessoas não qualificadas.

Os testes de ELISA em papel já foram desenvolvidos e referenciados em artigos para detecção do vírus bacteriófago T7, da bactéria *Escherichia coli* e do protozoário *Leishmaniana* mas, que seja do nosso conhecimento, para a bactéria *L. pneumophila* este foi o primeiro trabalho desenvolvido. Para além disso, foi o primeiro a utilizar nos testes de ELISA o suporte em papel de fotocópia e um processo de lavagem utilizando papel adsorvente como substituto às micropipetas, que provou ser mais eficiente, prático e simples. Estas são as contribuições do presente trabalho para a evolução da tecnologia *Lab-on-Paper*.

Em conclusão, com este trabalho verificou-se que era possível realizar esta técnica em papel de fotocópia com resultados promissores diminuindo assim substancialmente os custos do teste. O custo do sensor de papel de fotocópia é muito inferior, 147 vezes menor em relação ao papel Whatman e 158 vezes menor quando comparando com a placa de poliestireno. Sendo assim, o teste em suporte de papel de fotocópia é extremamente competitivo e por isso, é auspicioso a investigação que se dedique à otimização da aderência dos imunoreagentes de forma a melhorar a sua sensibilidade.

**Capítulo 6****6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Posthuma-Trumpie G, Korf J, Amerongen A, "Lateral flow (imuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393: 569-582.
- [2] Morrison D, Dokmeci M, Demirci U, "Clinical Applications of Micro- and Nanoscale Biosensor", *Biomedical Nanostructures*, 2008, 1: 433-458.
- [3] Yu J, Ge L, Huang J, Wang S, Ge S, "Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid", *Lab on a chip*, 2011, 11(7): 1286–1291.
- [4] Dungchai W, Chailapakul O, Henry C, "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices", *Analytica chimica acta*, 2010, 674(2): 227–233.
- [5] Martinez A, Phillips S, Whitesides G, "Diagnostics for the Developing World: Microfluidic paper based analytical Devices", *Analytical Chemistry*, 2010, 82: 3-10.
- [6] Veigas B, Jacob J, Costa M, Santos D, Viveiros M, Inácio J, Martins R, Barquinha P, Fortunato E, Baptista, P, "Gold on paper - paper platform for Au-nanoprobe TB detection", *Lab on a Chip*, 2012.
- [7] Velho J, "Mineral fillers for paper why,what,how," First edit. *Tecnicelipa*, 2003.
- [8] Hu J, Wang S, Wang L, Li F, Pingguan-Murphy B, JianLu T, Xu F, "Advances in paper-based point-of-care diagnostics", *Biosensors and Bioelectronics*, 2013.
- [9] Roberts J, "The Chemistry of Paper", *The Royal Society of Chemistry*, 1996.
- [10] Zhou M, Yang M, Zhou F, "Paper based colorimetric biosensing platform utilizing cross-linked siloxane as probe." *Biosens Bioelectron.* 2014, 15 (55): 39-43.
- [11] McCarthy W, "An Investigation of the mechanism of alkaline sizing with alkenyl succinic anhydride", *The Institute of Paper Science and Technology*, 1987.
- [12] Marques A, "Desenvolvimento de um sensor colorimétrico em papel para a deteção de bactérias eletroquimicamente ativas", Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2014.
- [13] Pelton R, "Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28(8): 925–942.
- [14] Dungchai W, Chailapakul O, Henry C, "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices", *Analytica chimica acta*, 2010, 674, 2: 227–233.
- [15] Jacob J, "Desenvolvimento de placas de microtitulação em papel", Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2013.
- [16] Li X, Ballerini D, Shen W, "A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends", *Biomicrofluidics*, 2012.
- [17] Apilux A, Dungchai W, Siangproh W, Praphairaksit N, Henry C, Chailapakul O, "Lab-on-paper with dual electrochemical/colorimetric detection for simultaneous determination of gold and iron.", *Analytical chemistry*, 2010, 82 (5): 1727–1732.

- [18] Carrilho E, Martinez A, Whitesides, G, "Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics." *Analytical chemistry*, 2009, 81: 7091–7095.
- [19] Costa M, "Desenvolvimento de microfluídica em papel para utilização em biossensores," Faculdade de Ciência e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [20] Weemen B, Schuurs A, "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates", *Febs Letters*, 1971, 15 (3): 232-236.
- [21] Engvall E, Perlmann P, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G", *Immunochemistry*, 1971, 8: 871-874.
- [22] "Technical Guide for ELISA", KPL.
- [23] Silva, Valmir, "Ensaio Imunoenzimático ELISA".
- [24] Carrilho, E.; Phillips, S.; Vella, S., "Paper microzone plates," *Analytical*, 2009.
- [25] Nawracala, Bernd, "Microtiter plate," U.S. Patent 60183882000, 2000.
- [26] Takátsy Gy, "The Use of Spiral Loops in Serological and Virological Micromethods", *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 1955.
- [27] Banks P, "The microplate market past, present and future microplates today – the global market," *Drug Discovery World*, 2009.
- [28] Cheng Chao-Min, Martinez A, Gong J, Mace Charles, Phillips Scott, Carrilho E, Mirica Katherine, Whitesides George, "Paper-Based ELISA", *Clinical Analytics*, 2010.
- [29] Wang S, Ge L, Song X, Yu J, Ge S, Huang J, Zeng F, "Paper-based chemiluminescence ELISA: Lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing", *Biosensors and Bioelectronics* 2012, 31: 212-218.
- [30] Murdock R, Shen L, Griffin D, Kelley-Loughnane N, Papautsky I, Hagen J, "Optimization of a Paper-Based ELISA for a Human Performance Biomarker", *Analytical Chemistry*, 2013, 85: 11634–11642.
- [31] Costa M, Veigas B, Jacob J, Santos S, Gomes J, Baptista P, Martins R, Inácio J, Fortunato E, "A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper", *Nanotechnology*, 2014, 25:1-12.
- [32] Hsu Min-Yen, Yang Chung-Yao, Hsu Wen-Hsin, Lin Keng-Hung, Wang Chun-Yuan, Shen Ying-Cheng, Chen Yu-Chen, Chau Siu-Fung, Tsai Hin-Yeung, Cheng Chao-Min, "Monitoring the VEGF level in aqueous humor of patients with ophthalmologically relevant diseases via ultrahigh sensitive paper-based ELISA", *Biomaterials*, 2014, 35: 3729-3735.
- [33] Hsu Chao-Ka, Huang Hsin-Yu, Chen Wan-Rung, Nishie W, Ujiiie H, Natsuga K, Fan Shu-Ting, Wang Hsi-Kai, Lee J, Tsaib Wei-Lun, Shimizu H, Cheng Chao-Min, "Paper-Based ELISA for the Detection of Autoimmune Antibodies in Body Fluid – The Case of Bullous Pemphigoid", *Analytical Chemistry* 2014, 86: 4605–4610.
- [34] Shih Cheng-Min, Chang Chia-Ling, Hsu Min-Yen, Lin Jyun-Yu, Kuan Chen-Meng, Wang Hsi-Kai, Huang Chun-Te, Chung Mu-Chi, Huang Kui-Chou, Hsu Cheng-En, Wang Chun-Yuan, Shen Ying-Cheng, Cheng Chao-Min, " Paper-based ELISA to rapidly detect *Escherichia coli*", *Talanta*, 2015, 145: 2–5.
- [35] Khan M, Pande T, Ven T, "Qualitative and quantitative detection of T7 bacteriophages using paper based sandwich ELISA", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 132: 264–270.

- [36] Puchades, R. et al., "A Comprehensive Overview on the Application of Low Injection Techniques in Immunoanalysis", *Analytical Chemistry*, 1992, 23, 4: 300-321.
- [37] Males D, Brostoff J, Roth D; Roitt I, "Imunologia", *Elsevier Medicina Brasil*, 2014.
- [38] Converse R, Martin R, "ELISA methods for plant viruses", 1990, pp. 179-196. *In Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*, Hampton E, Ball E, Boer S, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- [39] Garnsey S, Cambra M, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)", 1993, pp.169-185. *In Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*, Martelli E, G. P, Rome.
- [40] Veitch, NC, "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme", *Phytochemistry*, 2004, 65, 3: 249–259.
- [41] Saavedra M, Borges A, "Legionella" in Ferreira, Wanda e Sousa, João Carlos, editores, "Microbiologia volume 2", *LIDEL*, 2007, 419-426.
- [42] Silva M, "Contribuição para o estudo do género Legionella e a sua ocorrência em Portugal", Lisboa, 1996.
- [43] Correia A, Ferreira J, Borges V, Nunes A, Gomes B, Capucho R, Gonçalves J, Antunes D, Almeida S, Mendes A, Guerreiro M, Sampaio D, Vieira L, Machado J, Simões M, Gonçalves P, Gomes J, "Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease", *The New England Journal of Medicine*, 2016, 374 (5): 497-498.
- [44] Fraser D, Tsai T, Orenstein W, "Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia", *New England Journal of Medicine*, 1977, 297: 1186-1196.
- [45] Greig J, Carnie J, Tallis G, "An outbreak of Legionnaires' disease at the Melbourne Aquarium, April 2000: investigation and case-control studies". *Med. J. Aust.* 2004, 180(11): 566–572.
- [46] Tilton R, "Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay". *Annals of Internal Medicine*, 1979, 90: 697- 698.
- [47] Birtles R, Harrison T, Samuel D, Taylor A, " Evaluation of urinary antigen ELI SA for diagnosing Legionella pneumophila serogroup 1 infection", *J Clin Pathol*, 1990, 43:685-690.
- [48] Murray P, Rosenthal K, Pfalle M, "Microbiologia Médica", Elsevier, 2015.
- [49] Upstone S, "Ultraviolet/Visible Light Absorption Spectrophotometry in Clinical Chemistry", in Wiley J, editor, "Encyclopedia of Analytical Chemistry", *Chichester*, 2000, 1699–1714.
- [50] Egerton R, "Physical Principles of Electron Microscopy" *Springer*, 2005, 125-151.
- [51] Luck P, Helbig J, Von H, et al, "Diagnostics and clinical disease treatment: usefulness of microbiological diagnostic methods for detection of Legionella infections", In: Cianciotto N, Kwaik Y, Edelstein P, et al, editors, "Legionella: state of the art 30 years after its recognition". Washington, DC: ASM Press, 2006, 15–21.
- [52] Briand H, Shin J, Lamatte C, Banz A, Dugua Jean-Mara, Evaluation of the bioNexia® Legionella test: comparative study with five other urinary antigen detection tests, *bioMérieux*, ESGLI London, 16-17 Setembro 2015.
- [53] Wu G, Zaman M, Low-cost tools for diagnosing and monitoring HIV infection in low-resource settings, World Health Organization 2012, 90:914-920.



## ANEXOS

### A – Protocolo do meio BCYE – $\alpha$ (Buffered Charcoal Yeast Extract)

#### REAGENTES:

- Água destilada;
- Legionella BCYE -  $\alpha$  agar Base – Oxoid;
- Legionella CYE growth supplement – Oxoid;

#### PREPARAÇÃO:

Para 100 mL de meio

1. Pesar 2,77 g de Legionella BCYE -  $\alpha$  agar Base;
2. Adicionar 100 mL de água destilada;
3. Colocar na placa elétrica até começar a ferver (aproximadamente 20 min). Ir agitando para homogeneizar o meio;
4. Autoclavar a 120°C durante 20 minutos e deixar arrefecer até à temperatura de 60°C
5. Adicionar Legionella CYE growth supplement e agitar.
6. Distribuir 20 mL em cada placa de Petri de 90 mm de diâmetro. Efetuar a operação numa câmara de fluxo laminar ou próximo de um bico de Bunsen.
7. Etiquetar as microplacas com a data e conserva-las a 2-8°C.

**Nota:** Efetuar o teste de esterilidade: colocar uma placa na estufa a 37°C, durante 2 dias e observar a existência ou não de crescimento.