



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DAS
IMUNOGLOBULINAS G PARA O VÍRUS DA
RUBÉOLA EM SÃO TOMÉ E PRÍNCIPE COM
RECURSO AOS *GUTHRIE CARDS***

VERA GERALDES VICENTE

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

OUTUBRO, 2016



Universidade Nova de Lisboa

**Estudo da prevalência das Imunoglobulinas G
para o vírus da rubéola em São Tomé e
Príncipe com recurso aos *Guthrie cards***

Autor: Vera Geraldês Vicente

Orientador: Professor Doutor Paulo Paixão

Coorientador: Mestre Maria de Jesus Chasqueira

Procedimento experimental realizado na Unidade de Infecção da NOVA Medical
School/Faculdade de Ciências Médicas

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Microbiologia Médica.

OUTUBRO, 2016

Publicações e Comunicações

Comunicação oral:

Vicente V; Caroça C; Chasqueira MJ; Paixão, P. Estudo da prevalência da IgG para o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe com recurso aos “Guthrie cards”: resultados preliminares. 14º Encontro Nacional de Actualização sobre Infeciologia, Porto, outubro 2015 (Anexo 1)

Pósteres:

Vicente V; Caroça C; Chasqueira MJ; Paixão, P. Estudo da prevalência das IgGs contra o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe com recurso aos “Guthrie Cards”. VI Congresso científico da ANL, Lisboa, maio 2016 (Anexo 2)

Caroça C, Vicente V, Campelo P, Chasqueira M, Caria H, Silva SN, Paixão P, Paço J. Rubella is still causing Hearing Loss. 13th Congress of the European Society of Pediatric Otorhinolaryngology, Lisboa, junho 2016 (Anexo 3)

Vicente V; Caroça C; Chasqueira MJ; Paixão, P. Prevalence of specific IgGs against study rubella vírus in São Tomé e Príncipe with “Guthrie Cards”. 19th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Lisboa, setembro 2016 (Anexo 4)

Artigo:

Submetido: Caroça C, Vicente V, Campelo P, Chasqueira M, Caria H, Silva SN, Paixão P, Paço J. Rubella in Sub-Saharan Africa and sensorineural hearing loss: a case control study. BMC – Public Health, março 2016 (Anexo 5)

Agradecimentos

*Aqueles que passam por nós não vão sós e não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.*

Antoine de Saint-Exupéry

A elaboração deste trabalho só foi possível devido a um variadíssimo conjunto de factores, entre os quais, a colaboração e apoio de pessoas a quem não posso deixar de agradecer.

Em primeiro lugar tenho que agradecer ao meu orientador Professor Doutor Paulo Paixão pelo apoio, orientação, sabedoria e a muita disponibilidade que sempre manifestou.

À minha co-orientadora, Mestre Maria de Jesus Chasqueira pela compreensão, disponibilidade, rigor e pelos seus ensinamentos ao longo deste percurso.

Ao grupo da Unidade de Infecção da NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas pelo afeto nas horas mais difíceis e pela perícia demonstrada.

Agradeço também à Dra Cristina Caroça por todo o carinho e colaboração dada no decorrer deste trabalho.

Ao coordenador do VI Mestrado em Microbiologia Médica, Professor Doutor João Piedade por toda a preocupação.

Aos meus amigos que sempre me acompanharam, apoiaram e estiveram sempre presentes nesta longa caminhada, em especial à Sara e à Cristina que, em todos os momentos, senti que estavam ao meu lado e que nunca deixaram de acreditar que eu era capaz.

Ao meu namorado João, pelo amor, compreensão e por todas as horas de paciência.

Por último e não menos importante agradeço à minha família pelo encorajamento e compreensão, especialmente aos meus pais, Mário e São por serem o meu maior exemplo e incentivo.

A todos o meu Bem-haja!

Resumo

A rubéola é uma doença viral contagiosa, geralmente benigna, que afeta essencialmente crianças. Nas grávidas, a transmissão ao feto pode originar a morte deste ou a síndrome da rubéola congênita. Devido à fácil transmissão do vírus surgem frequentemente epidemias com elevadas taxas de morbidade, no entanto, a incidência da infecção por rubéola diminuiu drasticamente após a implementação da vacina contra o vírus. São Tomé e Príncipe (STP) é um dos países onde ainda não existe vacinação para a rubéola. Estudos de seroprevalência de outros vírus têm recorrido à utilização dos *Guthrie cards* (DBS), uma vez que são de fácil colheita, armazenamento e requerem quantidades mínimas de amostra. O presente estudo tem como objectivo determinar a prevalência da IgGs contra o vírus da rubéola numa população de STP, recorrendo à utilização dos, *Guthrie cards* validando previamente o método.

Foram analisadas 316 amostras de indivíduos com idades compreendidas entre os 2 e os 35 anos, colhidas nos respectivos DBS entre janeiro e maio de 2014. Para validar o método foram determinados os parâmetros: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), eficiência, linearidade, coeficiente variação inter e intra-ensaio. O método implementado tem uma sensibilidade de 89%, uma especificidade de 100%, um VPP de 100%, um VPN de 50% e uma eficiência de 75%.

A prevalência das IgGs contra o vírus da rubéola em STP foi de 64% sendo Mé zóxi a região mais afetada. A prevalência é semelhante em ambos os géneros verificando-se um aumento progressivo da prevalência das IgGs em função da idade.

Os DBS mostraram ser uma ferramenta útil para estudos de vigilância epidemiológica em regiões com recursos limitados. A seroprevalência da rubéola na população de STP foi elevada, sugerindo que as infeções naturais continuam a ser comuns nesta região. Assim sendo, torna-se importante a implementação de um plano de vacinação para controlar a disseminação da rubéola em STP.

Palavras chave: Rubéola , *Guthrie cards*, prevalência

Abstract

Rubella is a contagious viral disease, usually benign, which affects mainly children. In pregnant women, the fetal spread can cause miscarriage or congenital rubella syndrome. Due to its easy transmission, epidemics arise frequently with high levels of morbidity. The incidence of rubella infection drastically decreases after vaccine implementation. São Tomé e Príncipe (STP) is one of the countries where vaccination for rubella still not available.

Seroprevalence studies regarding other viruses have used *Guthrie cards* (DBS) since they are easy to harvest, store and require minimum amounts of sample. Our study aims to determinate the prevalence of IgGs against rubella virus in STP's population, through the use of DBS, following the respective method validation. We analyzed 316 samples harvested from individuals between the ages of 2 and 35 years, using DBS between January and May of 2014. To validate the method several parameters were determined: sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), efficiency, linearity, coefficient variation inter and intra assay. The validation of our method reached 89% sensitivity, 100% specificity, 100% PPV, 50% NPV and 75% efficiency.

The prevalence of rubella virus IgGs in STP was 64%, being Mé zóxi the most affected region. The prevalence is similar in both genders, showing a progressive increase as the age advances.

The DBS proved to be a useful tool for epidemiological surveillance studies in regions with limited resources. The high seroprevalence of rubella in the population of STP suggests that the natural infections continue to be common in this region, making it imperative to implement a vaccination plan in order to control the spreading of this virus in STP.

Keywords: Rubella, *Guthrie cards*, prevalence

Índice

1. Introdução	1
1.1. Rubéola	1
1.1.1. Contextualização histórica	1
1.1.2. Taxonomia, estrutura e replicação do vírus	2
1.1.3. Transmissão e patogénese do vírus da rubéola	4
1.1.4. Resposta imunológica	6
1.1.5. Epidemiologia	8
1.1.6. Diagnóstico	10
1.1.7. Prevenção	13
1.1.7.1. Impacto da vacinação contra a rubéola	16
1.2. Guthrie cards	17
1.3. Objetivo do estudo	20
2. Materiais e Métodos	21
2.1. Seleção do <i>kit</i> de ELISA para a determinação das IgGs específicas contra o vírus da rubéola	21
2.2. Validação do método de extração das IgGs específicas contra o vírus da rubéola a partir do <i>Guthrie card</i>	21
2.2.1. Amostras	21
2.2.2. Parâmetros avaliados	22
2.3. Estudo da prevalência das IgGs específicas contra o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe	25
2.3.1. População em estudo	25
2.3.2. Amostras	26
2.3.3. Procedimento experimental	28

3. Resultados	34
3.1. SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion) versus RUBELLA ELISA IgG (Vircell)	34
3.2. Validação do método de extração das IgGs específica para o vírus da rubéola a partir do Guthrie card.	36
3.2.1. Estudo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência	36
3.2.2. Estudo da linearidade	41
3.2.3. Estudo do coeficiente de variação intra-ensaio	43
3.2.4. Estudo do coeficiente de variação inter-ensaio	44
3.3.1 Determinação da prevalência das IgGs específicas contra o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe	47
3.3.2. Distribuição das IgGs específicas positivas contra o vírus da rubéola por idade	47
3.3.3. Distribuição das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola por sexo	48
3.3.4. Distribuição das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola por regiões	49
3.3.5. Distribuição dos resultados das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe	50
3.3.6. Comparação dos resultados de IgGs específicas contra o vírus da rubéola entre as crianças de São Tomé e Príncipe e as crianças de Portugal. ..	50
4. Discussão e Conclusões	52
5. Referências bibliográficas	58
6. Anexos	65

Lista de Abreviaturas

CDC- do inglês *Center Diseases Control and Prevention*

C.V.- coeficiente de variação

DBS- do inglês *Dried Blood Spots*

DO- densidade ótica

ELISA- do inglês *Enzyme-Linked Immuno Sorbentassay*

EUA- Estados Unidos da América

FN- falso negativo

FP- falso positivo

HL- Hospital da Luz

IgG- imunoglobulina da classe G

IgM- imunoglobulina da classe M

INF- α - interferão alfa

LCR- Líquido céfalo-raquídeo

LPC- laboratório de patologia clínica

MHC- do inglês *Major Histocompatibility Complex*

NK- do inglês *Natural Killer*

nm- nanómetro

OMS- Organização Mundial da Saúde

r^2 - coeficiente de determinação

RNA- do inglês *Ribonucleic Acid*

rpm- rotações por minuto

RT-PCR- do inglês *Real Time Polymerase Chain Reaction*

s- desvio padrão

SIDA- Síndrome da imunodeficiência adquirida

STP- São Tomé e Príncipe
T.A.- temperatura ambiente
TCD4- linfócito T auxiliar
TCD8- linfócito T citotóxico
Th1- do inglês células T *helper 1*
Th2- do inglês células T *helper2*
TLR- do inglês *Toll-like receptor*
UI- unidades internacionais
VAS- Vacina contra o sarampo
VASPR- Vacina tríplice contra o sarampo, papeira e rubéola
VIH- Vírus da imunodeficiência humana
VN- verdadeiro negativo
VP- verdadeiro positivo
VPN- valor preditivo negativo
VPP- valor preditivo positivo
 μ - média
 μ l – microlitro
°C- grau Célsius

1. Introdução

1.1. Rubéola

1.1.1. Contextualização histórica

Inicialmente a rubéola foi considerada uma variante de sarampo ou escarlatina, ficando também conhecida como a “terceira doença”. Foi descrita pela primeira vez por médicos alemães em meados do século XVIII, tendo sido denominada de “Rötheln”, também designada de sarampo alemão⁽¹⁾. Mais tarde, surgiu o nome rubéola, derivado do latim *ruber* que significava vermelho e *ola* que é diminutivo, ou seja, “pequeno vermelho”^(2, 3).

Em 1914, no seguimento de um estudo em macacos, Hess postulou a etiologia viral desta doença tendo sido confirmada por Hiro e Toska apenas em 1938⁽³⁾.

Na sequência de uma epidemia generalizada de infeção por rubéola, o oftalmologista australiano Norman Gregg (figura 1), em 1941, relacionou os efeitos da infeção intrauterina por rubéola com o aparecimento de cataratas e malformações cardíacas em recém-nascidos. Este trabalho contribuiu para que o vírus ganhasse uma nova notoriedade. Na sequência deste trabalho, foi publicado um artigo sobre a síndrome da rubéola congénita onde foi relatada a ocorrência de cataratas em 78 crianças nascidas após a infeção materna por rubéola, no início da gravidez^(4, 5).



Figura 1-Norman Gregg, o oftalmologista australiano que relacionou os efeitos de infeção intrauterina por rubéola com o aparecimento de cataratas, (de <http://fn.bmj.com/content/92/6/F513/F1.expansion>).

Em 1962, dois grupos independentes conseguem isolar pela primeira vez o vírus da rubéola. Parkman isola o vírus a partir de células de rim do macaco verde africano infetado com células de garganta de indivíduos com rubéola⁽⁶⁾, enquanto Weller isola o vírus a partir de amostras de sangue e urina⁽⁷⁾.

Na história, em 1963, este vírus aparece com grande impacto na Europa espalhando-se para os Estados Unidos da América (EUA), entre 1964 e 1965⁽⁵⁾. Nesta altura, esta epidemia causou cerca de 12 500 000 de casos de rubéola, 20 000 casos de síndrome de rubéola congénita e registaram-se 11 000 óbitos⁽³⁾. Como consequência deste surto iniciaram-se estudos com o objetivo de produzir uma vacina que foi licenciada em 1969, a primeira vacina nos EUA. Após a introdução da vacina observou-se uma grande diminuição dos casos de rubéola e da síndrome de rubéola congénita. No entanto, nos anos 80 surge um novo surto de rubéola nos EUA o que implicou uma nova política de vacinação. Passou então a administrar-se duas doses, a primeira realizada entre os 12 e os 15 meses de idade e a segunda dos 4/5 anos ou aos 11/12 anos⁽⁸⁾.

Em 2002, muitos países já incluíram a vacina contra a rubéola no seu plano nacional de vacinação. A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2014, declara a erradicação da rubéola na Colômbia, tornando-se o primeiro país americano a eliminar a doença dentro das suas fronteiras. No ano seguinte, o território americano tornou-se a primeira região a eliminar a transmissão endémica do vírus da rubéola e da síndrome da rubéola congénita⁽⁹⁾.

Atualmente, a OMS tem, no seu plano para a erradicação da rubéola, estabelecido o ano de 2020 como meta final^(10, 11).

1.1.2. Taxonomia, estrutura e replicação do vírus

O vírus da rubéola é um membro da família *Togaviridae*, de transmissão não artrópode e o único membro do género *Rubivirus* (tabela 1) ^(12, 13). Este vírus causa uma das principais doenças exantemáticas, a rubéola⁽¹⁴⁾.

Tabela 1-Taxonomia do vírus da rubéola de acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses*

Taxonomia do vírus da rubéola	
Grupo	Grupo IV (+ssRNA) da classificação de Baltimore
Família	<i>Togaviridae</i>
Género	<i>Rubivirus</i>
Espécie	vírus da rubéola

As partículas esféricas deste vírus com cerca de 40 a 80 nm de diâmetro apresentam simetria icosaédrica e estão rodeadas por uma membrana lipídica protetora – invólucro. Este vírus contém um núcleo composto por uma cadeia simples de RNA de polaridade positiva que constitui o seu genoma. Este, está organizado de forma semelhante ao dos alfavírus, codificando duas proteínas não estruturais: p90 e p150 responsáveis pela replicação e transcrição do RNA mensageiro subgenómico⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Para além destas, codifica também três proteínas estruturais: a proteína da cápside C (protege o RNA viral) e duas glicoproteínas do envelope: a E1 e a E2^(14, 16-18). Estas glicoproteínas formam estruturas semelhantes a “espículas” no envelope e são responsáveis por induzir as principais respostas imunitárias^(17, 19, 20). As mesmas são ainda responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira para além de terem propriedades hemaglutinizantes^(16, 21).

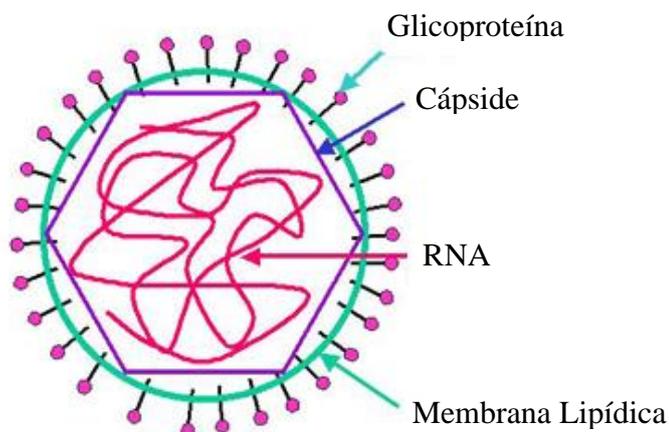


Figura 2- Representação esquemática da estrutura do vírus da rubéola, (adaptada de <http://www.misodor.com/RUBEOLA.pt>)

A infecção de uma célula hospedeira suscetível inicia-se pela ligação do virião, mediada pela glicoproteína E2, a um recetor celular indefinido na membrana plasmática. A entrada por endocitose conduz o virião até aos endossomas, onde o pH baixo induz a libertação do genoma viral no citoplasma, através da fusão do involucro viral com a membrana do endossoma. Posteriormente, em associação com os ribossomas a RNA-replicase, específica do vírus, sintetiza uma grande poliproteína que traduz as proteínas não estruturais p90 e p150. O processamento progressivo desta poliproteína não estrutural, determina a função do complexo de replicação na transcrição sucessiva do RNA de polaridade negativo (antigenómico), do RNA de polaridade positivo (genómico) e do RNA mensageiro (subgenómico)^(17, 22).

As proteínas estruturais do vírus da rubéola, C, E1 e E2, são produzidas a partir de um RNA subgenómico 24S, sendo estas produzidas a partir de uma única poliproteína precursora C-E2-E1. Depois, uma sequência sinal contribui para translocação da glicoproteína E2 e E1 para o lúmen do reticulo endoplasmático, onde a peptidase catalisa e cliva esta poliproteína em C-E2 e E2-E1⁽²³⁾. A proteína C do vírus da rubéola não possui atividade de auto-proteólise. Assim sendo, esta mantém-se associada à glicoproteína E2 e à membrana do reticulo endoplasmático. Esta característica é exclusiva do vírus da rubéola. As nucleocápsides formadas pela proteína da cápside e pelo RNA viral, migram até à membrana citoplasmática onde a interação com o domínio citoplasmático da glicoproteína E2 induz a gemulação e formação de viriões completos⁽²⁰⁻²²⁾. A capacidade do vírus da rubéola maturar dentro da célula “escondido”, do sistema imunitário do hospedeiro, pode ser uma importante característica para estabelecer infecções persistentes no Homem⁽²⁴⁾.

1.1.3. Transmissão e patogénese do vírus da rubéola

A rubéola é uma infecção que se caracteriza por um exantema agudo de evolução benigna, exceto quando atinge o feto durante a gravidez⁽²⁵⁾. Esta doença afeta principalmente crianças e jovens adultos, ocorrendo muitas das vezes sobre a forma subclínica⁽²⁶⁾. O vírus da rubéola infeta exclusivamente o ser humano pelo que, a presença do vírus na natureza depende unicamente de indivíduos suscetíveis na comunidade. A transmissão do vírus da rubéola advém da inalação de aerossóis contendo partículas virais emitidas

por um indivíduo infetado por rubéola ou por via sanguínea, no caso da transmissão vertical⁽²⁵⁾.

Após a inalação das partículas virais, o vírus replica-se nas membranas das mucosas do trato respiratório superior e posteriormente, espalha-se para os gânglios linfáticos regionais⁽²⁶⁾. A virémia ocorre 5 a 7 dias após o contacto com o vírus manifestando-se através de febre causada pela produção de interferão e outras citocinas pós-inflamatórias. Esta termina com o aparecimento de anticorpos circulantes e é coincidente com o aparecimento do exantema (2-3 semanas após a infeção)⁽²⁶⁾. A infeção pelo vírus da rubéola geralmente provoca uma doença leve cuja sintomatologia é semelhante a outras infeções virais inespecíficas e inclui dor de garganta, febre baixa, mal-estar geral e adenopatias (sobretudo nos gânglios cervicais posteriores e occipitais)^(26, 27).

O sinal mais característico da rubéola é o exantema maculopapular, que surge entre 16 a 20 dias após a infeção⁽²⁰⁾. Numa primeira fase este surge no rosto propagando-se posteriormente para o resto do corpo, desaparecendo ao fim de 48 horas. A ocorrência de sequelas ou morte é rara, sendo as consequências mais graves a artralgia ou a trite aguda, com perda de mobilidade das articulações. Contudo, a resolução destas complicações poderá por vezes demorar algumas semanas e em casos esporádicos anos^(2, 3, 19, 28). Contrariamente, na mulher grávida, a infeção *in útero* pode levar à síndrome da rubéola congénita da criança uma vez que a transmissão do vírus ao embrião é feita através da placenta. A replicação viral estende-se a quase todos os órgãos e tecidos do embrião nos quais o vírus estabelece uma infeção crónica não lítica. Esta pode ter várias consequências que vão desde a reabsorção do embrião (aborto espontâneo), passando pela manifestação de uma série de malformações congénitas que podem ser detetadas por ecografia, durante a gravidez, no recém-nascido ou até manifestarem-se tardiamente⁽²⁹⁾. O risco da síndrome da rubéola congénita diminui à medida que o tempo de gestação avança. Embora o vírus infete a maioria dos tecidos do embrião, as gestações podem continuar até ao seu término⁽³⁰⁾.

A síndrome da rubéola congénita, incluiu:

- Manifestações oculares: cataratas (na maioria dos casos), glaucoma, córnea nublada, retinite pigmentosa, coriorretinite e microftalmia⁽³¹⁾;
- Manifestações neurológicas: surdez neurosensorial⁽³¹⁾ (na maioria dos casos), microcefalia⁽³¹⁾, hidrocefalia, meningoencefalite, pan-encefalite progressiva, letargia, irritabilidade, apoplexias, atraso psicomotor e mental e autismo⁽³²⁾;
- Problemas sistémicos: hepatoesplenomegalia⁽³¹⁾, icterícia, estenose cardiovascular periférica e das válvulas pulmonares, miocardite, mal formações do arco aórtico, erupção purpúrea, estenose arterial/renal, hipertiroidismo ou hipotiroidismo, hipoplasia do timo, diabetes *mellitus*, pneumonia intersticial, produção deficiente da hormona de crescimento e puberdade precoce^(27, 33, 34).

A maioria das crianças infetadas congenitamente apresenta títulos virais consideráveis nas secreções nasofaríngeas e na urina, durante aproximadamente 2 anos^(19, 29).

1.1.4. Resposta imunológica

A resposta imune à infeção pelo vírus da rubéola é comum à maior parte das infeções virais provocadas por vírus de RNA de cadeia simples. A resposta imunológica inata é mediada pelos recetores TLR 7/8 onde, dessa interação resulta a produção de interferão alfa (IFN- α). A partir da produção deste ocorre a ativação das células *Natural Killer* (NK). Estas células têm extrema importância na resposta imune inata, uma vez que, são capazes de eliminar as células infetadas pelo vírus. Outro mecanismo utilizado pelas células NK para inibir o processo de infeção é a lise de células que não expressam o complexo MHC de classe I, uma vez que, a expressão dessa molécula pode ser inibida pelo vírus. No entanto, o vírus pode transcender a resposta imune inata devido à sua elevada taxa de replicação, assim, paralelamente, também ocorre a ativação da resposta antigénio específica. Devido à natureza da infeção pelo vírus ser intracelular, os antigénios são apresentados pelo complexo MHC da classe I que desencadeia uma resposta de linfócitos TCD8+, que será potencializada pela ativação de linfócitos TCD4. Estas células podem diferenciar-se em Th1 ou Th2 dependendo das citocinas

apresentadas. Assim, no início da infeção pelo vírus da rubéola a resposta induzida é pelas células Th1 e já na fase final da doença a resposta muda para Th2⁽³⁵⁾.

Outro mecanismo eficiente da imunidade adaptativa contra o vírus da rubéola é a produção de anticorpos. Estes anticorpos atuam principalmente como moléculas neutralizantes para evitar a interação do vírus com a célula hospedeira, ligando-se ao envelope viral. Os anticorpos da classe IgM são produzidos no início do processo infeccioso, enquanto que os anticorpos da classe IgG específico são produzidos com um ligeiro atraso em relação aos primeiros. Os anticorpos IgM para o vírus da rubéola são detetáveis geralmente 2 a 5 dias após o aparecimento do exantema maculopapular e persistem no organismo até 3 meses após a infeção. A presença destes traduz uma primo-infeção recente de rubéola, sendo a deteção dos anticorpos da classe IgM o principal método de diagnóstico para a infeção aguda do vírus da rubéola. Os anticorpos da classe IgG para o vírus da rubéola tornam-se detetáveis no organismo alguns dias após o aparecimento dos anticorpos da classe IgM, e permanecem no organismo ao longo da vida, atingindo o nível mais alto 2 a 3 meses após a infeção⁽²⁶⁾. A presença destes no organismo traduz imunidade natural ou adquirida após a vacinação^(19, 36).

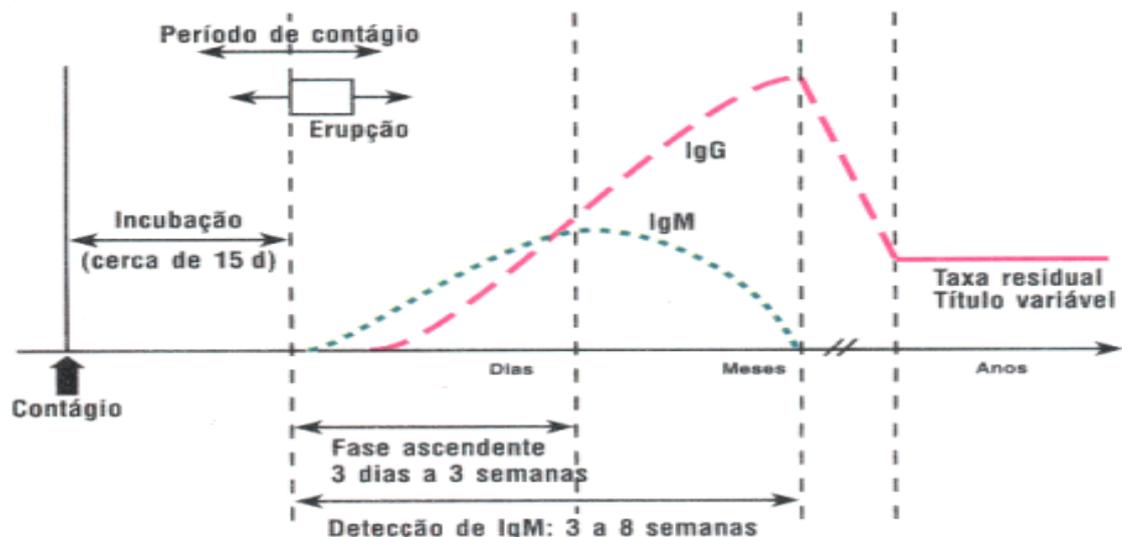


Figura 3- Esquema representativo da relação entre os aspetos clínicos e serológicos da rubéola, (de <http://www.labmed.pt/NotasTecnicas07.asp>).

Estudos pós-vacinação indicam que a vacinação mimetiza a resposta imunitária de uma infeção natural, embora o nível de anticorpos específicos detetados seja habitualmente mais baixo do que se a resposta for por uma infeção natural⁽¹⁹⁾.

1.1.5. Epidemiologia

Como já foi referido ao longo deste texto, a rubéola é uma doença viral aguda que afeta normalmente crianças suscetíveis e jovens adultos por todo o mundo. Esta infeção é perigosa devido ao efeito teratogénico do vírus⁽²⁶⁾. A rubéola ocorre geralmente num padrão sazonal, com o pico de incidência da infeção no final do inverno e início da primavera. As grandes epidemias podem levar a elevados níveis de morbidade, exemplificando, a epidemia de rubéola que ocorreu nos EUA (entre 1964 e 1965), resultou em 12 500 000 milhões de casos de rubéola⁽²⁶⁾. A incidência da infeção por rubéola diminuiu drasticamente após a implementação da vacina contra o vírus. Com a administração da vacinação em 2009, conseguiu-se eliminar a transmissão do vírus da rubéola na América⁽⁹⁾.

Segundo a OMS, dois terços da população mundial ainda não beneficia desta vacina, tornando-se deste modo suscetível a esta infeção. Exemplo disso é o continente africano (em 1996 nasceram cerca de 22 000 crianças com síndrome de rubéola congénita). Estes números são semelhantes aos que encontramos atualmente, pois a OMS estima que poucos países da região africana introduziram a vacinação contra a rubéola nos seus programas de imunização surgindo assim, cerca de 100 000 casos de rubéola congénita por ano. A vacinação em larga escala durante a última década, reduziu drasticamente os casos de rubéola e em algumas situações, conseguiu eliminar os casos da síndrome da rubéola congénita em países desenvolvidos⁽²⁶⁾.

No início do ano de 2013, foi descrito um surto de rubéola no Japão com mais de 4 000 casos. Os indivíduos afetados são essencialmente do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 20 e os 39 anos devido a uma baixa cobertura vacinal desde grupo populacional⁽³⁷⁾.

Na Europa, a rubéola é uma doença de declaração obrigatória. Desde 2010 que os casos de rubéola são maioritariamente reportados pela Polónia sendo que, em 2013 o número de casos nesta região era de 385594. Contudo, o número de casos diminuiu significativamente no ano seguinte devido fundamentalmente à vacinação, verificando-se apenas 6516 casos. De todos os casos notificados, apenas 3% foram confirmados laboratorialmente devido à falta de testes laboratoriais para identificar o vírus da rubéola⁽¹¹⁾.

Em 2015, os países da União Europeia contribuíram com os seus dados epidemiológicos relativos à rubéola, à exceção da Bélgica e França. Durante 12 meses, foram relatados 193 casos de rubéola, no entanto, apenas 1,3% (n=73) dos casos foram confirmados laboratorialmente (serologia ou isolamento do vírus), sendo que, 16 destes países não relataram casos de rubéola. Observou-se um maior número de casos de rubéola em indivíduos com idades compreendidas entre os 1 e os 4 anos, registando-se uma maior taxa de notificação na Polónia. Observou-se que o maior número de casos notificados foi no mês de março⁽³⁸⁾.

Entre os meses de janeiro e março deste ano, observaram-se 17 casos de rubéola sendo que destes, 12 foram relatados pela Polónia e apenas 3 foram confirmados laboratorialmente.

Em Portugal, nos últimos 8 anos foram notificados 3 casos de síndrome de rubéola congénita, dois quais 2 foram importados do continente africano e 1 foi autóctone, uma vez que, a mãe não viajou para fora do território nacional e não foi possível estabelecer nenhuma ligação epidemiológica entre a infeção materna e o contacto com um caso importado⁽³⁹⁾.

Não houve mortes relativamente à rubéola nos últimos anos⁽³⁸⁾.

A OMS tem como objetivo a eliminação da rubéola nos estados membros da região europeia. Esta eliminação é essencial para a prevenção dos casos de síndrome de rubéola congénita, definindo-se como a ausência de casos endémicos numa área geográfica delimitada por um período de pelo menos 12 meses, onde exista um sistema de vigilância epidemiológica eficaz. A eliminação regional pode ser declarada após a

ausência de rubéola num período igual ao superior a 36 meses. Embora todos os progressos realizados no sentido da eliminação da rubéola, o objetivo ainda não foi alcançado pois, 16 países foram declarados com transmissão endémica interrompida, 8 foram classificados como tendo ainda uma transmissão endémica e 5 como inconclusivos. Para interromper a circulação do vírus é necessária uma cobertura vacinal (segunda dose) em todos os países. Assim, para as metas de eliminação serem alcançadas é necessário que a taxa de vacinação de segunda dose seja também alcançada, fechando lacunas existentes nos programas de imunização. Os sistemas de vigilância também devem ser altamente sensíveis e geograficamente representativos de forma a assegurar a investigação e gestão atempada de casos suspeitos. A investigação laboratorial é essencial pois são necessários dados epidemiológicos sobre o genótipo para rastrear cadeias de transmissão⁽³⁸⁾

1.1.6. Diagnóstico

Existem várias doenças exantemáticas que mimetizam a infeção pelo vírus da rubéola uma vez que, os sintomas mais frequentemente associados a esta (adenopatia, febre, exantema cutâneo), podem estar associados a infeções com outros vírus como o sarampo, o vírus do herpes 6 ou o parvovírus B19. Assim sendo, o diagnóstico diferencial da rubéola torna-se fundamental e só pode ser efetuado mediante testes laboratoriais específicos. Da mesma forma, o diagnóstico da síndrome da rubéola congénita não pode ser feito exclusivamente com base em evidências clínicas^(29, 36, 40). O vírus da rubéola pode ser isolado a partir de amostras de secreções nasofaríngeas, sangue, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR)⁽³¹⁾.

As evidências laboratoriais confiáveis para o diagnóstico de rubéola são culturas virais positivas, deteção do genoma viral por uma reação de polimerase em cadeia por *real time* (RT-PCR), ou a presença de anticorpos IgM específicos contra o vírus da rubéola^(17, 41, 42).

O diagnóstico pode ser efetuado mediante culturas virais de amostras de secreções nasofaríngeas, urina ou sangue total, colhidos logo que possível após o aparecimento do exantema maculopapular. As amostras devem ser refrigeradas (4-8°C) e transportadas de imediato para o laboratório, uma vez que, o vírus da rubéola é sensível ao calor. As

culturas virais são morosas e exigem um trabalho intensivo pelo que não são realizadas por todos os laboratórios. Assim, este método de diagnóstico não é utilizado na rotina laboratorial para a deteção da rubéola, sendo utilizado em laboratórios de referência ou de investigação (fundamentais no estudo dos surtos)⁽⁴³⁾.

A deteção do genoma viral, como já foi referido anteriormente, é feita através de uma técnica de RT-PCR, permitindo amplificar os ácidos nucleicos virais possibilitando detetar uma quantidade residual de partículas virais. A técnica de RT-PCR é relativamente rápida, com um elevado grau de sensibilidade e especificidade, sendo uma técnica fundamental para o diagnóstico e vigilância epidemiológica da rubéola. A vigilância virológica pode ser usada para monitorizar as vias de transmissão e para identificar a interrupção da transmissão endémica^(17, 42).

A serologia, ou seja, a determinação de anticorpos específicos para o vírus da rubéola, é um método laboratorial usado para confirmar o diagnóstico da doença, assim como para a determinação do estado imunológico do indivíduo⁽³⁶⁾. A interpretação dos resultados da serologia deve ser realizada sempre que possível em conjunto com as informações clínicas para um diagnóstico mais correto. A infeção pode ser confirmada pelo aumento significativo dos títulos de anticorpos específicos contra o vírus da rubéola em amostras de sangue (soro). A amostra de sangue deve ser colhida o mais cedo possível, 7 a 10 dias e novamente no período de 14 a 21 dias depois o início da doença, de forma a verificar a seroconversão. Esta inicia-se entre o 1º e o 3º dia após o começo do exantema maculopapular, com aparecimento de anticorpos IgM específicos para o vírus da rubéola. O nível de anticorpos ascende até a 3ª semana após o início da doença, começando a decair progressivamente até desaparecer. A presença do anticorpo IgM específico para o vírus traduz uma infeção recente de rubéola. A presença do anticorpo IgG específico para o vírus da rubéola começa a detetar-se alguns dias após o aparecimento de anticorpos IgM específicos. Os anticorpos IgG específicos para o vírus tendem a ascender progressivamente ao longo do tempo e atingem o seu nível mais alto, 2 a 3 meses após o começo do exantema maculopapular. A partir daí, os níveis do anticorpo IgG descem lentamente até atingirem um valor residual que se mantém ao longo da vida, conferindo imunidade contra a rubéola^(3, 36).

Para realizar o diagnóstico serológico da rubéola pode recorrer-se a uma técnica de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immuno Sorbent assay*). A técnica de ELISA é um teste imunoenzimático que permite a deteção de anticorpos específicos. Esta técnica é utilizada essencialmente no diagnóstico de doenças que induzem a produção de imunoglobulinas, como no caso da rubéola. A técnica de ELISA foi desenvolvida pelos investigadores Peter Perlmann e Eva Engvall na universidade de Estocolmo^(40, 44). O método utilizado para realizar este teste baseia-se na interação de antígeno-anticorpo específico que permite a deteção de pequenas quantidades de antígenos, péptidos, hormonas ou anticorpos num determinada amostra. Esta técnica utiliza antígenos ou anticorpos marcados com uma enzima para detetar as moléculas biológicas pretendidas. As enzimas utilizadas mais frequentemente para este fim, são a fosfatase alcalina e a glucose oxidase. Geralmente, o antígeno em fase fluida é imobilizado em placas de microtitulação com 96 poços em que este antígeno se liga a um anticorpo específico o qual, é futuramente detetado por um anticorpo secundário marcado com a enzima. Um substrato cromogéneo adicionado à reação, produz uma mudança de cor visível ou por fluorescência, indicando a presença do analito. Contudo, a técnica de ELISA apresenta algumas limitações como a mudança da cor mediada pela enzima que vai reagir indefinidamente, a intensidade da cor vai reagir interminavelmente, daí surgir a necessidade de ler espectrofotometricamente num período de tempo específico (por norma até 1 hora)⁽⁴⁵⁾.

Como já foi referido anteriormente, para a determinação de anticorpos específicos para o vírus da rubéola é utilizada uma placa de microtitulação com 96 poços. Os poços da microplaca são revestidos com os antígenos da rubéola e, caso existam anticorpos na amostra estes ligam-se ao antígeno fixo. Um anticorpo secundário conjugado com a enzima fosfatase alcalina deteta e liga-se ao complexo imune formado anteriormente. É ainda adicionado a esta reação um substrato incolor, o p-nitrofenilfosfato, que é convertido no produto corado p-nitrofenol. A intensidade do sinal do produto desta reação é proporcional à concentração do analito na amostra que posteriormente é quantificado por espectrofotometria^(40, 44, 45).

1.1.7.Prevenção

Vários microorganismos são responsáveis por colocar em perigo a vida humana. Estes reproduzem-se rapidamente e aproveitam baixas de imunidade para infetar e proliferar o homem. Ao longo do tempo, de forma a contrariar esta vulnerabilidade dos microrganismos, o homem desenvolveu estratégias para minimizar o impacto destes na saúde.

Em 1796 verificou-se que, a exposição a pequenas quantidades de antigénio eram capazes de estimular o organismo a produzir anticorpos que conferiam proteção contra o agente infeccioso. Assim, surge oficialmente a primeira vacina⁽⁴⁶⁾. A vacinação tem como objetivo imunizar/proteger o ser humano contra determinadas doenças como por exemplo a rubéola. Além da proteção individual, a maior parte das vacinas tem a capacidade de interromper a circulação dos microrganismos entre as pessoas, conferindo “imunidade de grupo”.

Conforme a epidemiologia das doenças, numa determinada zona ou país, são eleitas as vacinas que integram os programas de vacinação nacionais. As vacinas são administradas mediante indicação médica considerando idades e grupos de risco assim como surtos. Graças à vacinação, milhares de vidas foram salvas e milhares de crianças tiveram a oportunidade de viver mais saudáveis, melhorando a saúde e o bem-estar das civilizações.

Em Portugal, administram-se vacinas desde o início do século XIX, mas foi apenas a partir de 1965, com a vacinação em massa contra a poliomielite e a criação do plano nacional de vacinação, que os benefícios foram considerados significativos. Desde então surgiu a necessidade de criar vacinas para os vírus mais prevalentes entre a população impedindo a propagação de doenças⁽⁴⁷⁾.

A rubéola pode ser prevenida pela vacinação sendo o principal objectivo desta prevenir a síndrome da rubéola congénita. O controlo e prevenção da rubéola baseia-se na imunização e por isso a OMS recomenda fortemente a vacinação⁽⁴⁸⁾.

A vacina da rubéola foi criada a partir de um vírus isolado de um nado morto infetado por rubéola em 1965 no Instituto Wistar – RA 27/3. Este vírus foi atenuado através de 25-30 passagens em cultura de tecidos (fibroblastos) não contendo assim, vestígios de pato, galinha ou proteína do ovo. A vacina contém pequenas quantidades de albumina humana, neomicina, sorbitol e gelatina⁽¹⁹⁾.

As políticas de controlo da rubéola e conseqüentemente da síndrome da rubéola congénita em Portugal e em vários países da Europa, passaram inicialmente por uma vacinação estratégica e seletiva. Cujos o principal objetivo desta vacinação era conferir imunidade às mulheres e aos seus futuros recém-nascidos, rapidamente evoluiu para uma estratégia combinada que visou diminuir a transmissão da rubéola na comunidade recorrendo à vacinação de ambos os sexos^(49, 50).

A vacina contra a rubéola em Portugal é a VASPR (vacina anti-sarampo, parotidite e rubéola), como foi referido anteriormente esta é composta a partir de estirpes virais vivas atenuadas. Esta vacina é tríplice e capaz de conferir proteção a três doenças: o sarampo, a parotidite e a rubéola⁽⁵⁰⁾.

A vacinação iniciou-se em 1973, com a VAS (vacina anti-sarampo) apenas dirigida a crianças até aos 5 anos de idade. Mais tarde, a vacina foi incluída no plano nacional de vacinação, administrando-se uma só dose entre os 12 e os 15 meses⁽⁵⁰⁾.

Em 1987, foi introduzida no plano nacional de vacinação a vacina contra a parotidite e a rubéola, sendo estas duas administradas em combinação com a vacina do sarampo, numa vacina trivalente a VASPR. A VASPR era então administrada numa única dose aos 15 meses e a VAS passou a ser utilizada só em condições específicas, ou seja, quando era necessária a imunização isolada contra o sarampo. Poucos anos mais tarde, em 1990, introduziu-se no plano nacional de vacinação uma segunda dose da VASPR sendo esta administrada aos 11/13 anos. Em 1999, o plano nacional de vacinação foi revisto e a segunda dose passou a ser administrada aos 5/6 anos de forma a abranger uma maior cobertura vacinal. Assim, recomenda-se a primeira dose da VASPR aos 15 meses e a segunda dose aos 5/6 anos, necessariamente antes da escolaridade obrigatória.

A segunda dose da VASPR é recomendada a ambos os sexos, independentemente da idade em que foi realizada a primeira dose de VAS ou VASPR. Deverá ser considerado um intervalo de pelo menos dois meses entre as duas doses. Nas mulheres em idade fértil, sem nenhuma dose anterior de vacina contra a rubéola ou cujo estado imunitário seja desconhecido, recomenda-se a administração de uma dose de VASPR⁽⁴⁹⁾.

Presentemente, a primeira dose de VASPR é administrada a crianças com 12 meses e segunda dose a crianças com 5/6 anos. A segunda dose da VASPR representa uma segunda oportunidade de imunização e não um reforço^(49, 50).

Por norma a VASPR não tem reações pós-vacinais no entanto, as reações mais comuns são ligeiras e incluem, febre, exantema e ocasionalmente, podem ainda surgir artralguas transitórias nas pequenas articulações^(49, 50). Existem poucas contra indicações para esta vacina contudo não deve ser administrada em indivíduos com problemas de imunossupressão severa, grávidas ou em indivíduos com reações alérgicas a neomicina⁽²⁶⁾. A desnutrição não é uma contra indicação e deve ser considerada uma indicação para vacinar⁽⁵¹⁾.

Com a implementação dos programas de vacinação contra a rubéola, a incidência da rubéola e as suas complicações associadas reduziram significativamente. Em Portugal foi notória a diminuição da incidência da síndrome da rubéola congénita após a introdução da vacina^(49, 50). Contrariamente ao que acontece em Portugal, e muito embora a vacina já se encontre disponível há cerca de 30 anos, a rubéola mantém-se endémica em países onde a vacina contra a rubéola não está disponível, não integrando os seus planos nacionais de vacinação. Alguns países africanos são exemplo disso, como é o caso de STP⁽⁵²⁾.

A OMS recomenda que todos os países adotem nos seus planos de imunização a vacina contra a rubéola, de forma a evitar a síndrome da rubéola congénita. Assim, em 2012 criou-se um plano global estratégico de luta contra o sarampo e rubéola abrangendo o período de 2012 a 2020. Este plano tem como objetivo atingir a eliminação de sarampo e rubéola em pelo menos 5 regiões da OMS até 2020. A estratégia centra-se na implementação de cinco componentes básicos:

- Alcançar e manter uma alta cobertura com duas doses de vacinação contra a rubéola;
- Controlar a doença através de um acompanhamento eficaz e avaliar os esforços programáticos para garantir o progresso e o impacto positivo das atividades de vacinação;
- Estabelecer e manter a preparação para eventuais surtos, criando uma resposta rápida a estes e tratamento eficaz dos casos;
- Comunicar e interagir com o público, para motivar e incentivar a população à vacinação;
- Conduzir a investigação e o desenvolvimento necessários para apoiar uma ação eficaz em termos de custo, melhorar a vacinação e instrumentos de diagnóstico;^(8, 10, 31, 46).

1.1.7.1. Impacto da vacinação contra a rubéola

A implementação da vacina contra a rubéola resultou numa significativa diminuição de incidência de infeção pelo vírus da rubéola em muitos países. Exemplificando, nos EUA estimaram-se 12,5 milhões de casos de infeção por rubéola congénita entre 1962 e 1965. Após a introdução da vacina naquele país, o número de infeções de rubéola caiu de 57686 para 12491⁽¹⁹⁾. Quando a vacina é apenas administrada em crianças, a média de idades das pessoas afetadas aumenta, ou seja, são observados mais casos em jovens adultos. No entanto, a incidência do vírus diminui caso a cobertura vacinal seja alta. Se a cobertura vacinal foi baixa e a vacina for apenas administrada em algumas crianças a circulação do vírus diminui. Ainda assim, não é suficiente pois a maior parte dos indivíduos mantém-se suscetível até à idade adulta, prevendo-se surtos de síndrome da rubéola congénita⁽⁵³⁾. Um exemplo disso foi o que aconteceu na Costa Rica, onde surgiu um surto da síndrome de rubéola congénita após um período em que apenas algumas crianças foram vacinadas⁽²⁶⁾. Por outro lado, se forem apenas vacinados indivíduos do sexo feminino em idade fértil, a incidência da síndrome da rubéola congénita diminui. Contudo, é improvável que a eliminação desta síndrome seja alcançada com esta estratégia pois exige que cada mulher suscetível seja eficazmente imunizada

Outra das consequências dos programas de vacinação contra a rubéola é a redução global dos níveis de anticorpos IgGs específicos contra o vírus em indivíduos vacinados, comparando-os com os indivíduos que adquiram imunidade através de infecção natural. Além disto, estudos demonstram que uma única dose de vacina pode não conferir imunidade, uma vez que mais de metade dos indivíduos permaneceu seronegativo. No entanto, 12 anos depois e após a segunda dose de vacina o sistema imunitário consegue responder de forma a conferir imunidade⁽¹⁹⁾.

Apesar destas considerações, está demonstrado que após a vacinação, o vírus selvagem deixa de circular, o que levará à interrupção da sua circulação e consequente eliminação⁽⁵³⁾.

1.2. *Guthrie cards*

Os *Guthrie cards*, também conhecidos como “Dried Blood Spots” (DBS), são um método de amostragem utilizado essencialmente para o diagnóstico de algumas doenças metabólicas, como o caso da fenilcetonúria nos recém-nascidos⁽⁵⁴⁾. O conceito deste método, no qual o sangue obtido através de punção capilar é transferido para papel de filtro, foi descoberto por Robert Guthrie (figura 6) em 1963, na Escócia, no diagnóstico de fenilcetonúria. Desde então, a triagem neonatal para a fenilcetonúria é feita através deste tipo de amostras⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾.



Figura 4- Robert Guthrie, médico responsável pelo diagnóstico da fenilcetonúria através dos DBS, (de <http://museumofdisability.org/virtual-museum/medicine-wing/medical-establishment-exhibit/>).

Atualmente, os DBS são também utilizados para o diagnóstico e monitorização de algumas doenças e de alguns agentes infecciosos. Exemplificando: hipertiroidismo congénito, degranocitose, hepatite⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾, citomegalovírus⁽⁶⁰⁾, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA)^(61, 62) e toxoplasmose⁽⁶³⁾. As amostras para os DBS são colhidas através de punção venosa ou capilar, cerca de 50 µl de sangue num papel de filtro Whatman, sendo seguidamente secas ao ar durante aproximadamente 24 horas. As amostras devem ser armazenadas em sacos hermeticamente fechados, de forma a reduzir a humidade e mantidas à temperatura ambiente, mesmo em climas tropicais⁽⁶²⁾. Os DBS são de fácil manuseamento e ao contrário das amostras de sangue convencionais, não requerem centrifugação imediata ou congelação podendo ser armazenados por longos períodos de tempo^(54, 64, 65). Este método de amostragem é menos invasivo do que a punção venosa e a sua recolha não exige um técnico especializado para a colheita⁽⁶⁶⁾. Comparativamente às amostras de sangue (soro), é um método mais económico, pois não necessita de eletricidade para a centrifugação nem uma cadeia de frio para o armazenamento e transporte das amostras para o laboratório^(66, 67). Além disso, os DBS são biologicamente menos perigosos⁽⁶²⁾. A simplificação da colheita, do armazenamento e transporte deste tipo de amostras pode ser uma ferramenta prática e útil para ambientes rurais, em que as infra-estruturas sejam limitadas, sendo uma grande vantagem para a vigilância epidemiológica de inúmeras doenças contagiosas^(64, 68, 69).

No entanto, os DBS também apresentam algumas desvantagens. Uma das desvantagens incide na secagem ao ar das amostras, uma vez que isto expõe as mesmas a eventuais contaminações a partir das superfícies expostas. Para além disto, a taxa de secagem é variável e baseada na humidade presente no ambiente, sendo que uma amostra vai ser mais rapidamente seca em locais de baixa humidade. As amostras têm uma maior estabilidade se o procedimento de secagem for mais rápido e o armazenamento em condições de baixa humidade. Outra das desvantagens recai sobre a aplicação adequada de sangue para o papel de filtro. As amostras devem ser colocadas no papel uniformemente, utilizando uma gota que permita cobrir toda a área do círculo, sendo que a gota não pode ser nem muito grande nem muito pequena. Por este motivo, não

pode ser o indivíduo a recolher a própria amostra. A cobertura de sangue desigual do círculo do *Guthrie card* pode limitar a qualidade da amostra^(61, 70).

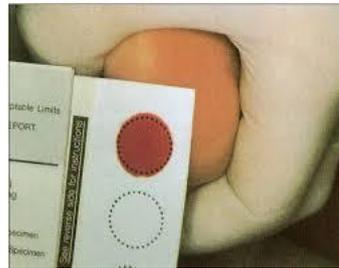


Figura 5- Colheita por punção capilar de uma amostra correta para o DBS em que a amostra cobre uniformemente o círculo do *Guthrie card*, (de, <http://differentgeneticstesting.yolasite.com/newborn-screening.php>).

Em virologia, os DBS podem ser utilizados quer para detecção de anticorpos⁽⁷¹⁾, quer para detecção de ácidos nucleicos⁽⁷²⁾. Foi com o primeiro propósito, detecção de anticorpos para o vírus da rubéola, que o presente trabalho foi planeado.

1.3.Objetivo do estudo

O principal objetivo deste estudo foi determinar a prevalência das IgGs específicas contra o vírus da rubéola na Ilha de São Tomé e Príncipe, com recurso a *Guthrie cards*.

O interesse nesta temática fundamenta-se na inexistência de vacinação na Ilha de São Tomé e Príncipe. A vacinação é um método eficaz para controlo e erradicação da infeção e já está presente nos programas de vacinação de inúmeros países, mas raramente no continente africano. Sendo o vírus da rubéola um importante agente de infeção congénita, será importante determinar a prevalência das IgGs específicas contra este vírus na população não vacinada, de forma a avaliar a prevalência da infeção natural nesta população. Por outro lado, com este estudo pretendeu-se demonstrar que os DBS são amostras credíveis e vantajosas para estudos epidemiológicos em regiões em que os recursos são limitados.

A população em estudo foi uma amostra de conveniência e as colheitas foram efetuadas durante missões humanitárias. Numa primeira fase foi necessário validar o método de extração das IgGs dos DBSs, por comparação com o método de referência (determinação das IgGs no soro).

2. Materiais e Métodos

2.1. Seleção do *kit* de ELISA para a determinação das IgGs específicas contra o vírus da rubéola

Antes de iniciar o estudo foram avaliados dois testes comerciais (*kits*) com o objetivo de investigar a sua capacidade para determinar as IgGs extraídas dos DBSs: o *kit* SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion) e o *kit* RUBELLA ELISA IgG (Vircell), cujos protocolos são apresentados no ponto 2.3.3.2.

Neste estudo foram utilizados 16 DBSs colhidos em crianças, com idades compreendidas entre os 9 meses e os 7 anos.

2.2. Validação do método de extração das IgGs específicas contra o vírus da rubéola a partir do *Guthrie card*

Para determinar qual o protocolo de extração das IgGs do DBS que apresentava melhor desempenho testaram-se três volumes diferentes de diluente: 200µl, 400µl e 800µl.

2.2.1. Amostras

Para validação e otimização do processo de extração das IgGs específicas contra o vírus da rubéola do DBS, foram utilizadas:

- 1) Amostras recolhidas de mulheres grávidas no Laboratório de Patologia Clínica (LPC) do Hospital da Luz (HL), com recolha em simultâneo de sangue venoso e DBS (n=20)
- 2) DBS recolhidos em crianças com idades compreendidas entre 9 meses e 10 anos (n=15). Estas amostras foram estratificadas quanto ao estado vacinal: crianças com idades compreendidas entre os 1 e os 10 anos (crianças vacinadas contra a

rubéola (n=10)) e crianças com idades entre 9 e 12 meses (crianças não vacinadas contra a rubéola (n=5)).

Os DBSs foram obtidos por deposição de aproximadamente 50µl de sangue colhido por punção venosa ou capilar, tendo ficado à temperatura ambiente (T.A.) durante 24 horas para secar. O seu armazenamento posterior foi à T.A. dentro de sacos de plástico hermeticamente fechados.

As amostras de soro foram obtidas por punção venosa para um tubo sem anticoagulante (com gel separador) tendo sido armazenadas a -4°C até ao seu processamento.

Todas as amostras foram colhidas no LPC do HL, em Lisboa, tendo os participantes assinado um consentimento informado autorizando a sua inclusão no estudo (anexo 6A). A confidencialidade da identidade dos participantes e dos dados recolhidos (estado vacinal) foi assegurada através da identificação das amostras unicamente por numeração sequencial, sendo que estas amostras foram utilizadas exclusivamente para fins académicos.

2.2.2. Parâmetros avaliados

Os parâmetros avaliados para a validação do método de extração das IgGs específicas contra o vírus da rubéola do DBS foram a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), eficiência, linearidade e coeficientes de variação inter e intra-ensaio.

2.2.2.1. Estudo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência

Numa primeira fase, estudou-se a sensibilidade, especificidade, VPP , VPN e eficiência da determinação das IgGs obtidas por extração dos DBS, utilizando como método de

referência a determinação das IgGs no soro (tabela 2). As amostras utilizadas neste estudo foram as 20 amostras recolhidas em grávidas (DBS + soro).

Tabela 2- Tabela de contingência que permite a comparação dos resultados das IgGs obtidas da extração do DBS e as IgGs do soro (método de referência)

		Soro	
		+	-
DBS	+	Verdadeiro positivo (VP)	Falso positivo (FP)
	-	Falso negativo (FN)	Verdadeiro negativo (VN)

Na extração das IgGs do DBS utilizou-se o protocolo descrito no ponto 2.3.3.1.

Para a determinação das IgGs em ambos os tipos de amostras utilizou-se o protocolo descrito em 2.3.3.2. e o *kit* SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/SERION). A amostra de soro foi diluída segundo as recomendações da casa comercial (10µl de soro em 1000µl de diluente).

Para os cálculos utilizaram-se as fórmulas⁽⁷³⁾

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{VP}{VP + FP} \times 100$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{VN}{FN + VN} \times 100$$

$$\text{Eficiência} = \frac{VPP + VPN}{2} \times 100$$

Numa segunda fase, compararam-se os resultados das IgGs obtidos pelo nosso método de extração *versus* o estado imunitário das crianças (vacinada ou não vacinadas). As amostras utilizadas para esta avaliação foram os 15 DBSs recolhidos nas crianças.

2.2.2.2. Estudo da linearidade

No estudo da linearidade utilizaram-se os 20 DBSs colhidos nas mulheres grávidas. A realização deste estudo foi efetuado pela análise visual do diagrama de dispersão obtido após regressão linear entre os valores esperados e obtidos para os volumes de diluente testados na extração das IgGs dos DBSs (200µl, 400µl e 800µl), tendo sido complementado pelo cálculo do coeficiente de determinação (r^2)^(74, 75).

Para a construção do diagrama de dispersão em abcissas foi colocado os valores esperados para os volumes de 400µl e 800µl (calculados a partir do resultado obtido com o volume de diluente de 200µl), e em ordenadas os valores efetivamente obtidos utilizando o protocolo descrito em 2.3.3.2.

2.2.2.3. Estudo do coeficiente de variação intra-ensaio

Na determinação do coeficiente de variação (C.V.) intra-ensaio utilizaram-se os 15 DBSs colhidos em crianças com idades entre os 9 meses e os 10 anos.

Para este estudo cada amostra foi extraída em duplicado, tendo posteriormente os extraídos sido analisados no mesmo ensaio de ELISA. Os cálculos foram efetuados utilizando a seguinte fórmula, onde s corresponde ao desvio padrão e μ à média:

$$C.V. = \frac{s}{\mu} \times 100$$

2.2.2.4. Estudo do coeficiente de variação inter-ensaio

Na determinação do C.V. inter-ensaio utilizou-se 45 DBSs provenientes de STP. Para este estudo cada amostra foi processada em dois ensaios independentes (extração e determinação das IgGs).

Para a determinação do C.V. inter-ensaio recorreu-se à fórmula assinalada no ponto anterior.

2.3. Estudo da prevalência das IgGs específicas contra o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe

2.3.1. População em estudo

A população em estudo foi constituída por indivíduos não vacinados para a rubéola, com idades compreendidas entre os 2 e os 35 anos (figura 6), sendo 173 do sexo feminino e 143 do sexo masculino.

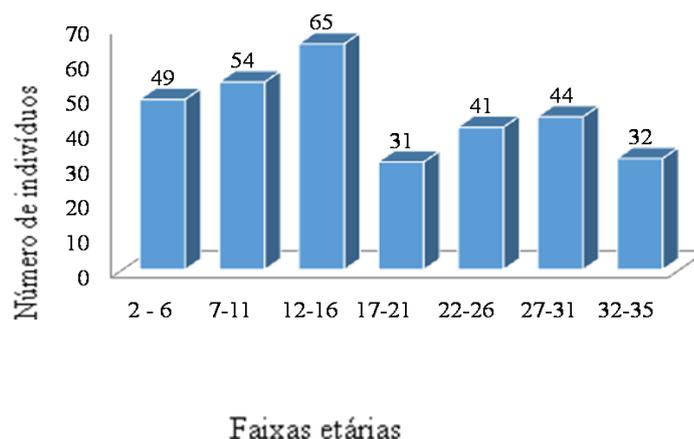


Figura 6- Distribuição dos 316 DBSs por faixas etárias.

2.3.2. Amostras

As 316 amostras em estudo foram recolhidas entre janeiro e maio de 2014, numa amostra de conveniência de indivíduos que recorreram à consulta de audiologia no Hospital Ayres de Menezes na Ilha de São Tomé e no Hospital Dr. Manuel Quaresma Dias da Graça na Ilha de Príncipe durante missões humanitárias. Todos os participantes no estudo são nativos e residem em STP (figura 7), sendo 186 indivíduos da região de Água Grande, 48 de Mé zóxi, 22 de Caué, 19 de Lobata, 18 de Cantagalo, 17 de Príncipe e 6 de Lembá.

Os 316 DBSs foram colhidos através de punção venosa ou capilar, onde se recolheu uma amostra de aproximadamente 50µl de sangue para cada círculo do DBS. Após a colheita, os DBS foram deixados à temperatura ambiente durante 24 horas para secar (figura 8). O armazenamento foi à temperatura ambiente tendo o doseamento das IgGs sido realizado em Portugal cerca de 9 meses após a colheita.

Todas as amostras foram colhidas em São Tomé e Príncipe, tendo todos os participantes assinado um consentimento informado autorizando a sua inclusão no estudo (Anexo 6B). A confidencialidade da identidade dos participantes e dos dados recolhidos foi assegurada através da identificação das amostras unicamente por numeração sequencial, sendo que estas amostras foram utilizadas exclusivamente para fins académicos.



Figura 7- Mapa da Ilha de São Tomé e Príncipe (de <http://www.ezilon.com/maps/africa/s%C3%A3o-tom%C3%A9-and-principe-maps.html>)

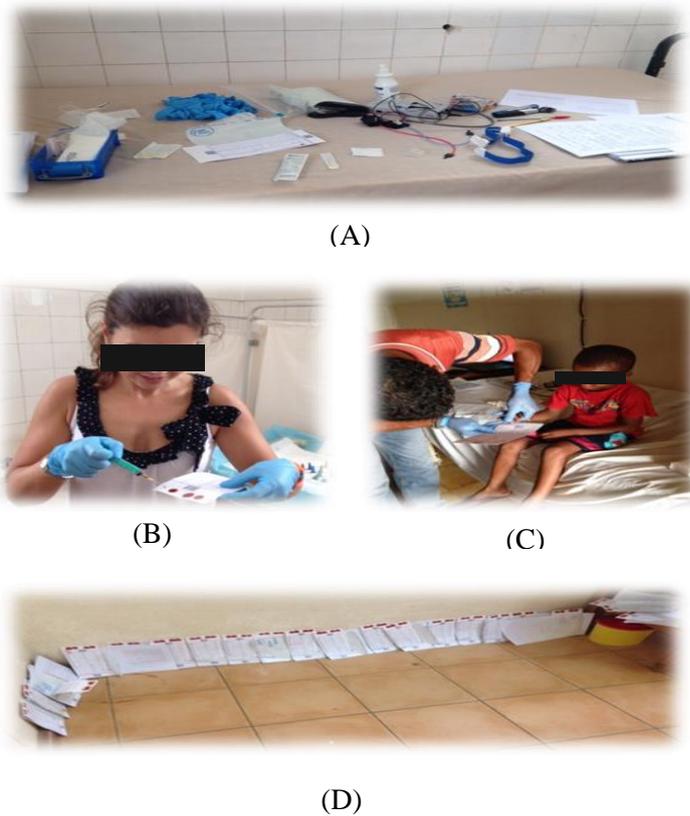


Figura 8- (A) Material utilizado na a punção (B) venosa ou (C) capilar para os *Guthrie cards* e (D) secagem dos mesmos.

Para além deste trabalho, as presentes amostras foram também utilizadas para a dissertação de doutoramento da Dra. Cristina Carocha que visa apurar as causas de surdez em STP

2.3.3. Procedimento experimental

2.3.3.1. Extração das IgGs específicas contra o vírus da rubéola dos *Guthrie cards*

Para a extração das IgGs utilizou-se $\frac{1}{4}$ de um círculo do DBS, correspondente a 32mm^2 , ao qual se juntaram $400\mu\text{l}$ de solução de diluição do *kit* SERION ELISA classic Rubella

Virus IgG. Seguidamente foi colocado num agitador, com agitação durante 1 hora a 600rpm e à T.A., e finalmente incubado a 4 °C durante 18 horas (figura 9).

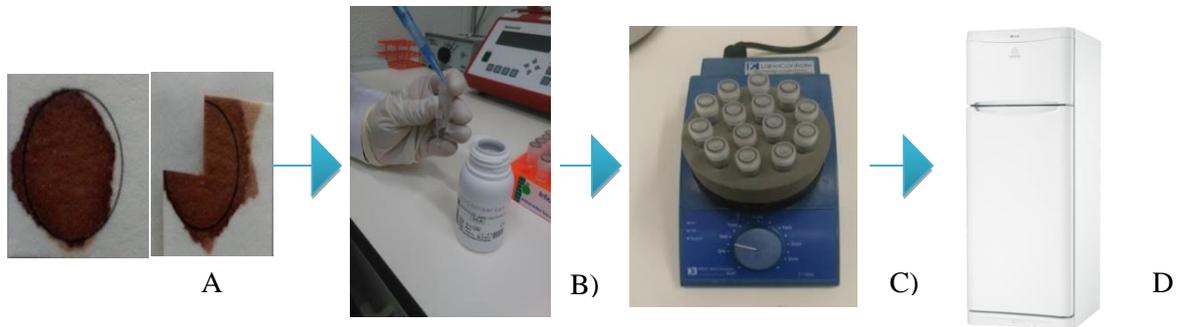


Figura 9– (A) Recorte de ¼ do *Guthrie Card* (B) Adicionar 400µl de solução de diluição, (C) Agitar durante 60 min a 600rpm à T.A., (D) Incubar a 4°C durante 18 horas.

2.3.3.2. Determinação das IgGs específicas contra o vírus da rubéola

Para a determinação das IgGs específicas do vírus da rubéola recorreu-se a uma técnica de ELISA.

Protocolo do *kit SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/SERION)*

Na determinação das IgGs utilizou-se o extraído obtido anteriormente no ponto 2.3.3.1., tendo-se efetuado o protocolo recomendado pela casa comercial.

- Pipetaram-se 100µl dos controlos, do soro padrão (em duplicado) e dos extratos, nos poços correspondentes, reservando-se o primeiro poço para o branco;
- Incubou-se a microplaca durante 60 minutos a 37°C em câmara húmida;
- Efetuou-se uma lavagem com 300µl de solução de lavagem. Este processo foi repetido 3 vezes;
- Adicionaram-se 100µl do conjugado IgG, exceto no branco;
- Incubou-se a microplaca durante 30 minutos a 37°C em câmara húmida;
- Repetiu-se o processo de lavagem;
- Adicionaram-se 100µl do substrato a todos os poços incluindo no branco;
- Incubou-se a microplaca durante 30 minutos a 37°C em câmara húmida;

- Adicionaram-se 100µl de solução de paragem;
- Leu-se a densidade ótica (DO) a um comprimento de onda de 415nm contra a referência de 630nm.

O ensaio só era aceite quando respeitava os seguintes critérios:

- A DO do branco foi inferior a 0.25;
- A DO do controlo negativo foi inferior a 0.200;
- A variação entre duas leituras do soro padrão não ter sido superior a 20%;
- A média da DO do soro padrão encontrar-se dentro do intervalo indicado no certificado de controlo de qualidade do lote.

Interpretação dos resultados:

As DO obtidas foram convertidas em unidades internacionais (UI) através do programa Serion Activity V11, após a introdução do código de cada lote, os resultados foram interpretados de acordo com o algoritmo representado na figura 10 que segue os critérios do Instituto Robert Koch⁽⁷⁶⁾.

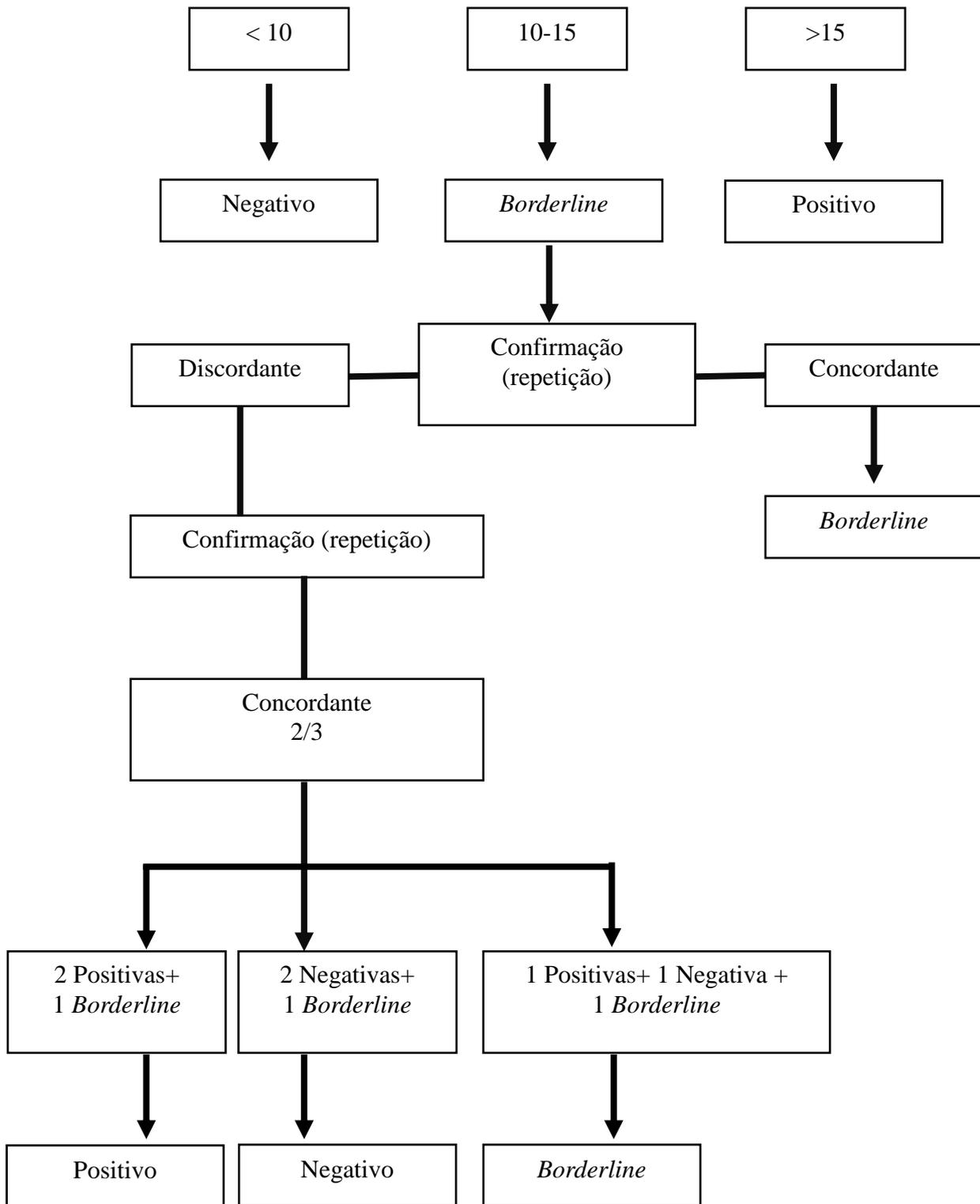


Figura 10 - Algoritmo de interpretação dos resultados de acordo com o Instituto Robert Koch. Os resultados são expressos em unidades internacionais (UI)

Protocolo do *kit* RUBELLA ELISA IgG (Vircell)

Este *kit* só foi utilizado no ponto 2.1 (Seleção do *kit* de ELISA para a determinação das IgGs específicas contra o vírus da rubéola) na determinação das IgGs utilizou-se o extraído obtido anteriormente no ponto 2.3.3.1. tendo-se efetuado o protocolo recomendado pela casa comercial:

- Nos poços correspondentes aos controlos/soro padrão pipetou-se 100µl do tampão de diluição e 5µl dos controlos positivo e negativo e soro padrão (em duplicado). Nos poços correspondentes às amostras pipetou-se 100µl do respetivo extrato;
- Incubou-se a microplaca durante 45 minutos a 37°C em câmara húmida;
- Efetuou-se uma lavagem com 300µl de solução de lavagem. Repetiu-se o processo 4 vezes;
- Adicionou-se 100µl do conjugado IgG;
- Incubou-se a microplaca durante 30 minutos a 37°C em câmara húmida;
- Repetiu-se o processo de lavagem;
- Adicionou-se 100µl do substrato;
- Incubou-se durante 20 minutos, à temperatura ambiente e no escuro;
- Adicionou-se imediatamente 50µl de solução de paragem;
- Leu-se a DO a um comprimento de onda de 450nm.

O ensaio só era aceite quando respeitava os seguintes critérios:

- A DO do controlo negativo foi inferior a 0.5;
- A DO do controlo positivo foi superior a 0.9;
- A DO do soro padrão esteve entre 0.55 e 1.5;

As DO foram convertidas para índice de anticorpos recorrendo à seguinte fórmula:

$$\text{índice de anticorpos} = \frac{\text{DO da amostra}}{\text{média de DO do soro padrão}} \times 10$$

Interpretação dos resultados:

Os resultados foram interpretados de acordo com o algoritmo representado na figura 12.

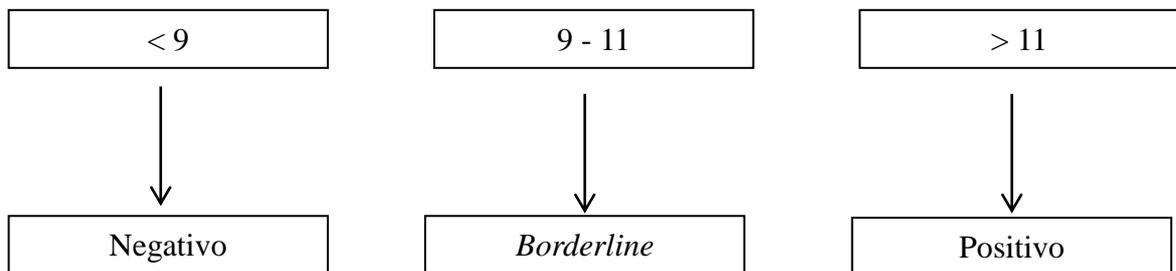


Figura 11 - Algoritmo de interpretação dos resultados de acordo a casa comercial. Os resultados são expressos em índices de anticorpos.

3. Resultados

3.1. SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion) versus RUBELLA ELISA IgG (Vircell)

Com o objetivo de selecionar o *kit* de ELISA a utilizar no presente trabalho testaram-se dois *kits* comerciais: SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion) e RUBELLA ELISA IgG (Vircell). Com este procedimento pretendeu-se avaliar a concordância dos resultados das IgGs extraídas dos DBS.

Na tabela 3 apresentam-se os resultados obtidos com as 16 amostras testadas, verificando-se que houve concordâncias em todos os resultados.

Tabela 3 – Valores obtidos com o *kit* da SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion) e com o *kit* RUBELLA ELISA IgG (Vircell). As amostras analisadas foram recolhidas de crianças com idades compreendidas entre 10 meses e 5 anos (n=16).

Amostra	Idade (anos/meses)	Sexo	Kit SERION ELISA ELISA classic Rubella VirusIgG	Kit da Vircell- RUBELLA ELISA
C6	10 meses	M	Negativo	Negativo
C3	1	F	Negativo	Negativo
C7	1	M	Positivo	Positivo
C9	1	M	Positivo	Positivo
C10	1	M	Positivo	Positivo
C1	2	M	Positivo	Positivo
C2	2	F	Positivo	Positivo
C4	2	M	Positivo	Positivo
C5	2	F	Positivo	Positivo
C8	2	M	Positivo	Positivo
C12	2	M	Positivo	Positivo
C13	3	F	Positivo	Positivo
C11	4	F	Positivo	Positivo
C14	4	F	Positivo	Positivo
C15	4	F	Positivo	Positivo
C16	5	F	Positivo	Positivo

Como ambos os *kits* têm protocolos similares e de fácil execução, e dado que existiu concordância nos resultados, seleccionámos o SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion) porque este permitia adicionalmente uma avaliação quantitativa.

3.2. Validação do método de extração das IgGs específica para o vírus da rubéola a partir do *Guthrie card*.

3.2.1. Estudo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência

No estudo da sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e eficiência comparou-se os valores das IgGs extraídas dos DBS *versus* as IgGs do soro (método de referência) em amostras colhidas em grávidas (n=20). Os resultados encontram-se na tabela 4. Os cálculos foram obtidos com as fórmulas apresentadas no ponto 2.2.2.1..

Tabela 4 -Valores das IgGs específicas contra o vírus da rubéola, no soro e no DBS com os diferentes volumes de diluição 200µl, 400µl, 800µl, recorrendo ao *kit* SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion).

Amostras				
	Soro	DBS		
		Volume de diluição 200µl	Volume de diluição 400µl	Volume de diluição 800µl
1G	24	50	14	7
2G	69	151	39	27
3G	92	141	31	25
4G	22	59	26	14
5G	86	171	47	24
6G	89	142	40	30
7G	4	10	5	4
8G	22	58	14	8
9G	27	38	17	9
10G	76	94	48	30
11G	28	92	29	19
12G	75	85	22	11
14G	82	150	68	38
15G	75	170	50	37
16G	76	90	57	27
17G	34	72	47	27
18G	5	23	9	8
19G	90	140	70	64
20G	40	72	22	28
21G	100	120	92	70

Para o volume de 200µl obteve-se uma sensibilidade de 100%, uma especificidade de 50%, um VPP de 95%, um VPN de 100% e uma eficiencia de 98% (tabela 5).

Tabela 5 - Tabela de contingência para o volume de diluição de 200µl

		Soro	
		+	-
DBS	+	18	1
	-	0	1

Para o volume de 400µl obteve-se uma sensibilidade de 89%, uma especificidade de 100%, um VPP de 100%, um VPN de 50% e uma eficiencia de 75% (tabela 6).

Tabela 6 - Tabela de contingência para o volume de diluição de 400µl

		Soro	
		+	-
DBS	+	16	0
	-	2	2

Para o volume de 800µl obteve-se uma sensibilidade de 72%, uma especificidade de 100%, um VPP de 100%, um VPN de 29% e uma eficiencia de 65% (tabela 7).

Tabela 7 - Tabela de contingência para o volume de diluição de 800µl

		Soro	
		+	-
DBS	+	13	0
	-	5	2

Na comparação dos resultados das IgGs específicas contra o vírus da rubéola obtidas pelo nosso método de extração *versus* o estado imunitário de crianças (vacinada ou não vacinada) (tabela 8), obteve-se uma sensibilidade de 80%, especificidade de 100% e eficiência de 86% (tabela 9). Quanto aos VPP e VPN de 100% e 72%, respectivamente. Os dois falsos negativos corresponderam a crianças de 4 e 5 anos, com 8UI e 11UI, respectivamente. Esta última, segundo o algoritmo utilizado no presente trabalho (figura 6) correspondia a um resultado *borderline*.

Tabela 8 -Valores das IgGs específicas contra o vírus da rubéola no DBS comparando com o estado vacinal recorrendo ao *kit* SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion). As amostras analisadas foram recolhidas de crianças (n=15).

Amostras	Idade (meses/anos)	Estado vacinal	Resultado quantitativo	Resultado qualitativo
14C	9 meses	Não	2	Negativo
7C	9 meses	Não	6	Negativo
12C	10 meses	Não	7	Negativo
15C	10 meses	Não	4	Negativo
13C	11 meses	Não	3	Negativo
8C	2anos	Sim	36	Positivo
4C	3 anos	Sim	79	Positivo
1C	4anos	Sim	98	Positivo
10C	4anos	Sim	8	Negativo
2C	5 anos	Sim	30	Positivo
3C	5 anos	Sim	11	<i>Borderline</i>
9C	5 anos	Sim	26	Positivo
11C	5 anos	Sim	20	Positivo
5C	6 anos	Sim	70	Positivo
6C	7 anos	Sim	15	Positivo

Tabela 9 - Tabela de contingência para o estado vacinal

		Estado vacinal	
		Vacinado	Não Vacinado
DBS	+	8	0
	-	2	5

3.2.2. Estudo da linearidade

No estudo da linearidade utilizaram-se os resultados da tabela 10 para a construção do gráfico (figura 13). Analisando os resultados do r^2 verificou-se que variaram entre 0.82 e 0.99, sendo que a maioria tem um valor de 0.94 indicando que a metodologia utilizada apresenta uma boa linearidade.

Tabela 10 -Resultados obtidos com o estudo da linearidade recorrendo ao *kit* SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion). As amostras analisadas foram recolhidas das mulheres grávidas (n=20).

Amostras	Volume de diluição						r ²
	200µl		400µl		800µl		
	Valor esperado	Valor obtido	Valor esperado	Valor Obtido	Valor esperado	Valor obtido	
7G	10	10	5	5	3	6	0,82
3G	141	141	71	31	36	25	0,92
19G	140	140	70	70	35	64	0,93
20G	72	72	36	32	18	28	0,93
6G	142	142	71	40	36	30	0,93
18G	24	24	12	9	6	8	0,93
2G	151	151	76	39	38	27	0,94
15G	170	170	85	50	43	37	0,94
8G	58	58	29	14	15	7	0,95
11G	93	93	47	29	24	19	0,95
5G	171	171	86	47	43	24	0,96
1G	50	50	25	14	13	7	0,97
16G	90	90	45	57	23	28	0,97
21G	120	120	60	93	30	70	0,98
9G	38	38	19	16	10	9	0,99
4G	30	59	15	26	8	13	0,99
14G	150	150	75	68	38	38	0,99
10G	94	94	47	48	24	30	0,99

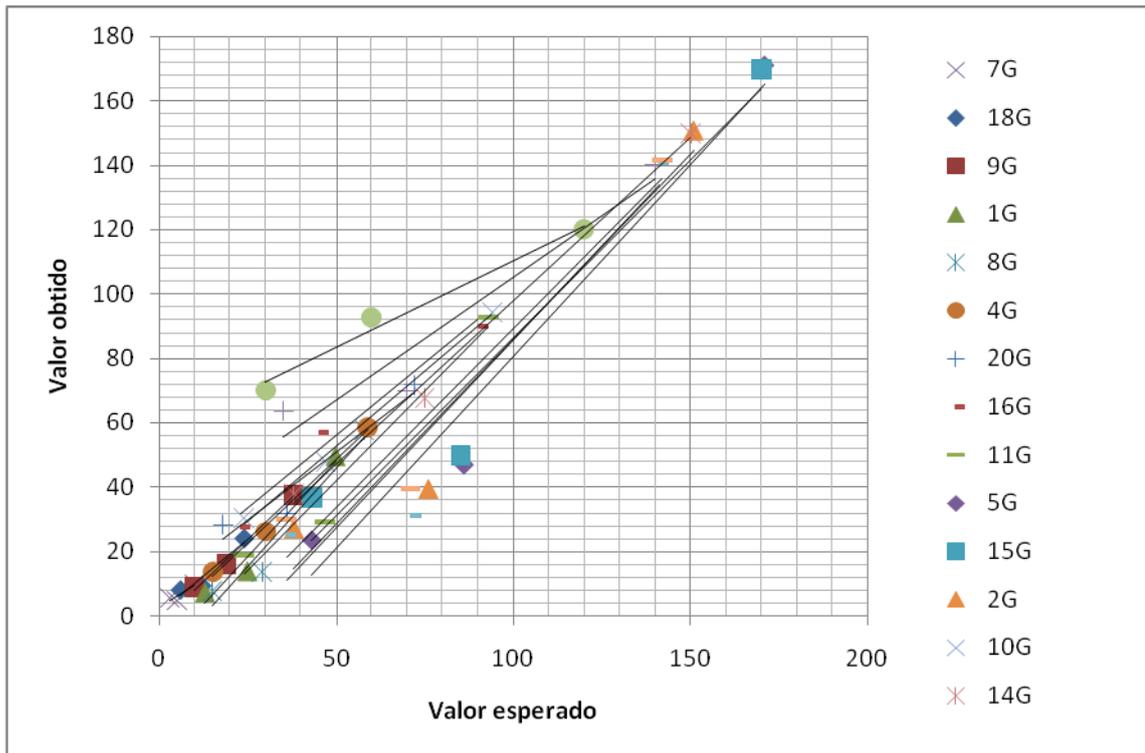


Figura 4 - Diagrama de dispersão com os resultados obtidos no estudo da linearidade

3.2.3. Estudo do coeficiente de variação intra-ensaio

Nas 15 amostras de DBSs analisadas em duplicado no mesmo ensaio, verificou-se que o C.V. variou entre 0% e 34% com uma média de 14%. Constatou-se que na faixa dos negativos (<10UI), das cinco amostras testadas três tiveram um C.V. de 0% e as restantes um C.V. de 11% e 20%. Na faixa dos positivos (>15UI), nas sete amostras testadas verificou-se que o C.V. teve uma maior variação, de 11% a 34%. Nas três amostras com valor entre 10UI e 15UI, os C.V. foram 0%, 11% e 26%. A amostra que apresentou o valor de 26% corresponde um valor negativo num dos duplicados e positivo no outro.

Os resultados utilizados nesta avaliação encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 - Valores obtidos no estudo do coeficiente de variação intra-ensaio das IgGs específicas contra o vírus da rubéola, extraídas dos DBS, e doseadas com o *kit* SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion).

Amostras	Resultado quantitativo	Resultado qualitativo	C.V. (%)
1C	76	Positivo	18
	97	Positivo	
2C	30	Positivo	11
	25	Positivo	
3C	10	<i>Borderline</i>	0
	10	<i>Borderline</i>	
4C	79	Positivo	30
	51	Positivo	
5C	64	Positivo	6
	69	Positivo	
6C	15	Positivo	11
	11	<i>Borderline</i>	
7C	6	Negativo	0
	6	Negativo	
8C	22	Positivo	34
	36	Positivo	
9C	16	Positivo	34
	26	Positivo	
10C	13	<i>Borderline</i>	26
	8	Negativo	
11C	20	Positivo	12
	17	Positivo	
12C	7	Negativo	11
	6	Negativo	
13C	3	Negativo	0
	3	Negativo	
14C	2	Negativo	0
	2	Negativo	
15C	4	Negativo	20
	3	Negativo	

3.2.4. Estudo do coeficiente de variação inter-ensaio

Nas 45 amostras de DBSs analisadas em duplicado em ensaios diferentes, verificou-se que os C.V. inter-ensaio variaram entre 0% e 77%, tendo uma média de 30%.

Verificou-se que na faixa dos negativos (<10UI) das 13 amostras testadas o C.V. variou entre 0% e 75%. Na faixa dos positivos (>15UI), o C.V. foi semelhante à faixa dos negativos, isto é, variou de 3 a 77%. Nos 3 valores *borderline* testados (>10UI e <15UI), os C.V. foram 0%, 5% e 7%. Os resultados utilizados nesta avaliação encontram-se na tabela 12.

Tabela 12- Valores obtidos no estudo do coeficiente de variação inter-ensaio das IgGs específicas contra o vírus da rubéola, extraídas dos DBS, e doseadas com o *kit* SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion).

Amostra	Resultado quantitativo	Resultado qualitativo	C.V (%)	Amostra	Resultado quantitativo	Resultado qualitativo	C.V. (%)
STP247	10	<i>Borderline</i>	47	STP75	26	Positivo	77
	5	Negativo			90	Positivo	
STP231	4	Negativo	0	STP237	10	Negativo	37
	4	Negativo			6	Negativo	
STP242	12	<i>Borderline</i>	0	STP20	11	<i>Borderline</i>	10
	12	<i>Borderline</i>			9	Negativo	
STP217	313	Positivo	50	STP101	20	Positivo	77
	151	Positivo			70	Positivo	
STP177	11	<i>Borderline</i>	27	STP27	8	Negativo	0
	7	Negativo			8	Negativo	
STP207	10	<i>Borderline</i>	38	STP59	23	Positivo	22
	6	Negativo			31	Positivo	
STP184	68	Positivo	44	STP256	111	Positivo	13
	36	Positivo			91	Positivo	
STP127	19	Positivo	12	STP30	10	<i>Borderline</i>	50
	17	Positivo			5	Negativo	
STP202	9	Negativo	0	STP165	14	<i>Borderline</i>	50
	9	Negativo			30	Positivo	
STP170	10	<i>Borderline</i>	22	STP176	21	Positivo	22
	8	Negativo			15	Positivo	
STP239	9	Negativo	61	STP28	20	Positivo	62
	4	Negativo			50	Positivo	
STP195	9	Negativo	43	STP197	51	Positivo	4
	5	Negativo			54	Positivo	
STP164	15	Positivo	18	STP79	12	<i>Borderline</i>	7
	19	Positivo			14	<i>Borderline</i>	
STP306	10	<i>Borderline</i>	57	STP12	70	Positivo	5
	4	Negativo			66	Positivo	
STP85	50	Positivo	26	STP172	21	Positivo	30
	34	Positivo			33	Positivo	
STP245	10	Negativo	50	STP25	11	<i>Borderline</i>	45
	5	Negativo			6	Negativo	
STP188	5	Negativo	13	STP70	12	<i>Borderline</i>	5
	4	Negativo			11	<i>Borderline</i>	
STP174	10	<i>Borderline</i>	57	STP91	21	Positivo	3
	4	Negativo			20	Positivo	
STP252	22	Positivo	31	STP93	21	Positivo	16
	35	Positivo			27	Positivo	
STP296	13	<i>Borderline</i>	36	STP109	23	Positivo	4
	8	Negativo			21	Positivo	
STP194	12	<i>Borderline</i>	30	STP102	14	<i>Borderline</i>	36
	8	Negativo			8	Negativo	
STP18	6	Negativo	75	STP89	15	Positivo	55
	2	Negativo			7	Negativo	
STP60	24	Positivo	60				
	60	Positivo					

3.3. Estudo da prevalência das IgGs específicas contra o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe

3.3.1 Determinação da prevalência das IgGs específicas contra o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe

Na análise dos 316 DBS, verificou-se que 203 apresentavam valores de IgGs > 15UI, 95 valores <10UI e 18 DBS valores entre 10UI e 15UI (tabela 14, anexo 7). Estes resultados apontam para uma prevalência de IgGs específicas contra o vírus da rubéola de 64% (figura 13).

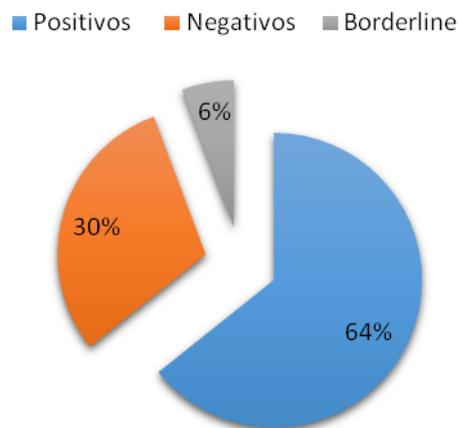


Figura 13- Distribuição dos resultados obtidos na determinação das IgGs específicas contra o vírus da rubéola nos 316 DBS colhidos em STP entre janeiro e maio de 2014.

3.3.2. Distribuição das IgGs específicas positivas contra o vírus da rubéola por idade

Dos 316 DBS analisados, verificou-se que a faixa etária que apresentou uma maior prevalência de IgGs positivas contra o vírus da rubéola foi a dos 32 aos 35 anos, correspondendo a uma prevalência de 90%. A faixa etária dos 7 aos 11 anos apresentou uma menor prevalência, de 45% de IgGs positivas (figura 14). Verificou-se que a prevalência de IgGs específicas contra o vírus da rubéola aumentou com a idade.

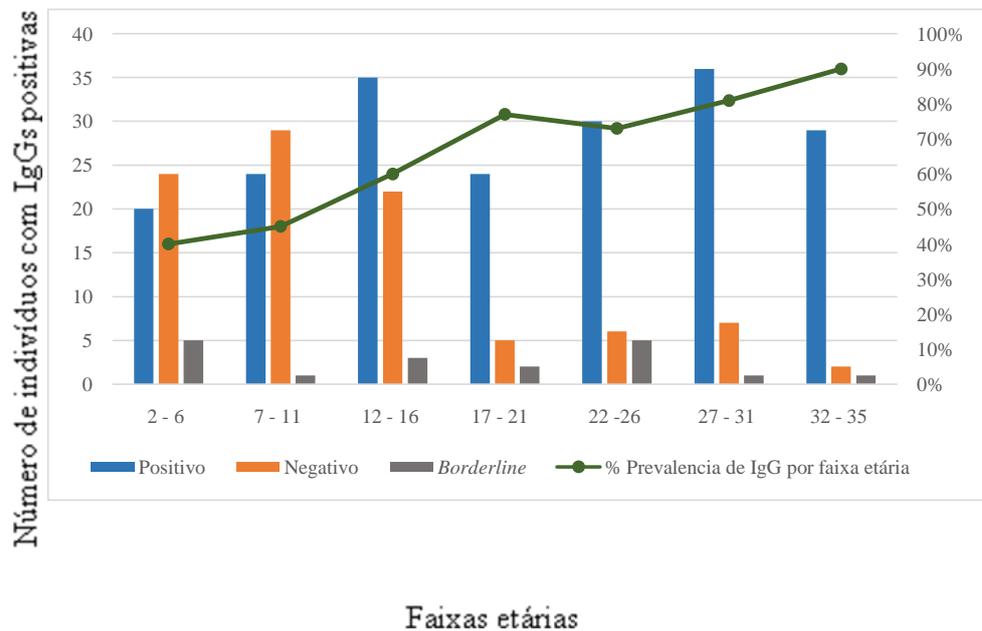


Figura 14- Distribuição dos resultados (positivos, negativos e *borderline*) nos 316 DBSs colhidos em STP entre janeiro e maio de 2014 organizados por faixas etárias.

3.3.3. Distribuição das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola por sexo

Na distribuição das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola (n= 203) por sexo, verificou-se que 111 amostras correspondem a indivíduos do sexo feminino e 92 amostras a indivíduos do sexo masculino (figura 15).



Figura 15-Distribuição das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola por sexo (n=203).

3.3.4. Distribuição das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola por regiões

Na distribuição das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola (n= 203) por região verificou-se que a prevalência é elevada por todo o território de STP, sendo Mé zóxi a região com maior prevalência, seguido de Lobata, Príncipe, Água Grande, Cantalago, Caué e Lembá, correspondendo, respectivamente, às seguintes percentagens de prevalência: 75%, 73%, 70%, 62%, 61%, 52% e 50% (figura 16).

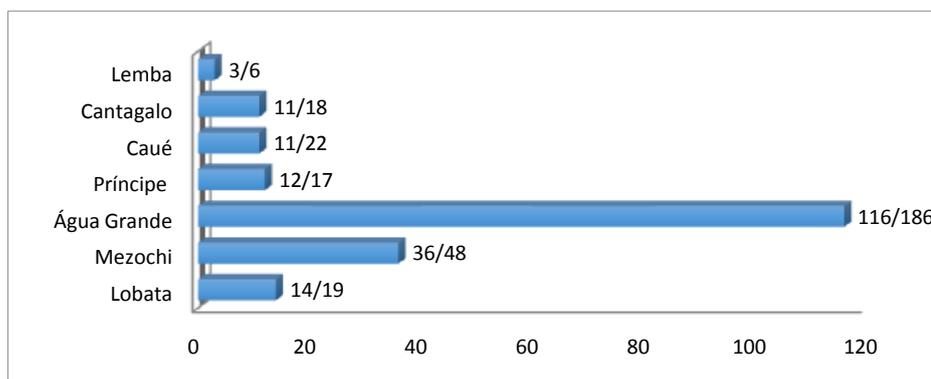


Figura 16-Distribuição das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola por regiões (n=203).

3.3.5. Distribuição dos resultados das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe

Os resultados das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola em STP (n=203) variaram entre 16UI e 233UI, sendo que a média foi de 63UI (figura 17).

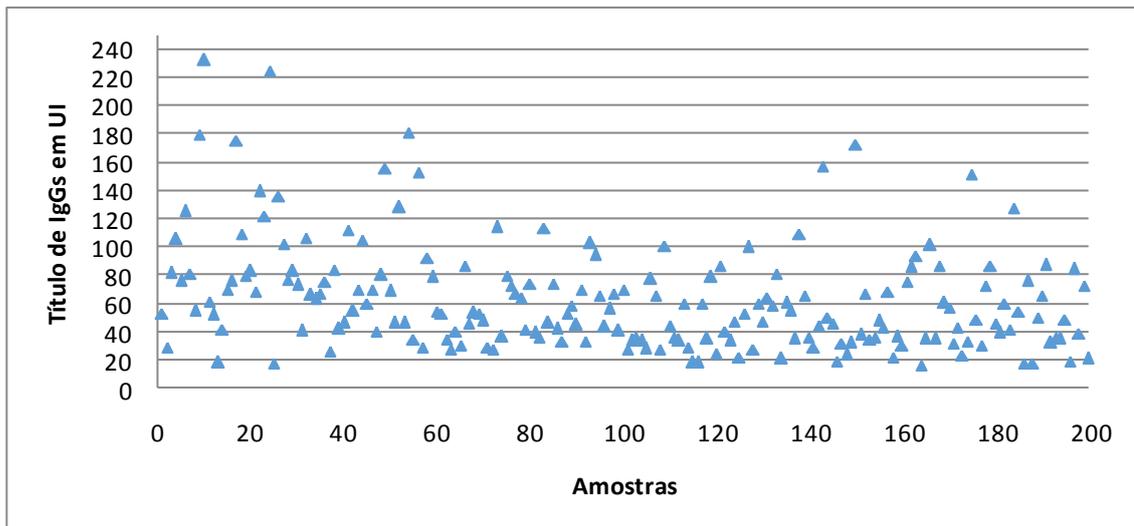


Figura 17- Distribuição dos resultados das IgGs positivas contra o vírus da rubéola (n=203)

3.3.6. Comparação dos resultados de IgGs específicas contra o vírus da rubéola entre as crianças de São Tomé e Príncipe e as crianças de Portugal

Os resultados quantitativos das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola em STP em crianças entre os 2 e os 6 anos de idade (n=20) variaram entre 18UI e 232UI, sendo que a média foi de 89UI (figura 18).

Em Portugal, em crianças com a mesma faixa etária (n=7) os valores variaram entre 20UI e 97UI, sendo que a média foi de 51UI (figura 19).

Comparando os níveis de IgGs específicas entre os dois países verificamos que as crianças de STP têm uma média mais elevada do que as crianças Portuguesas (respetivamente 50.9 e 89.35; teste Mann-Whitney, hipótese unidireccional, $p=0.03362$).

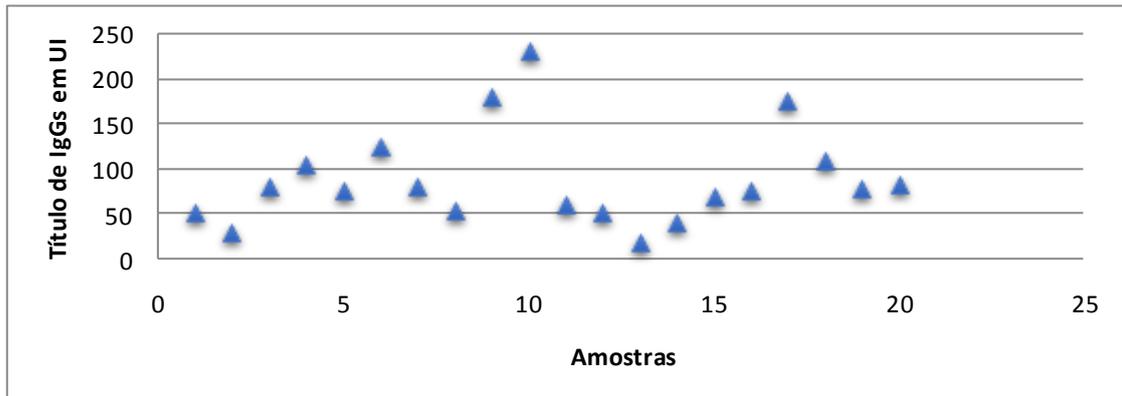


Figura 18- Distribuição do título das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola em crianças de STP (n=20)

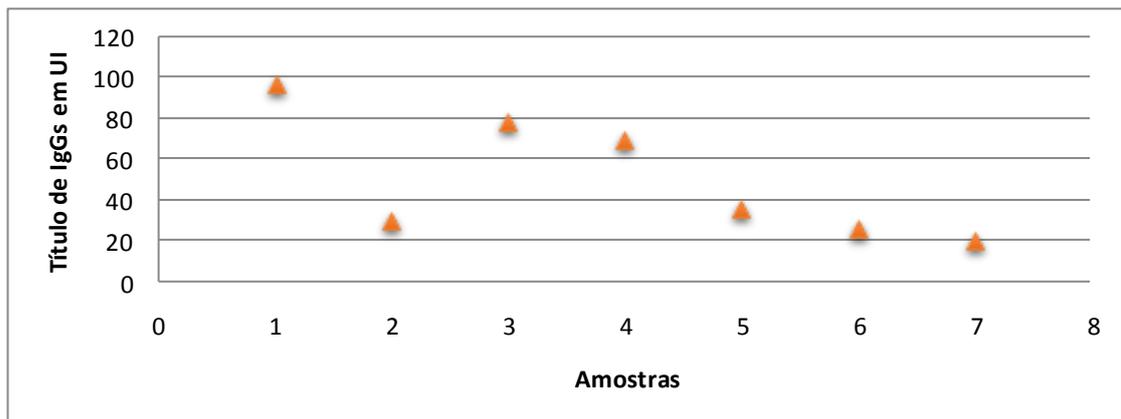


Figura 19- Distribuição do título das IgGs positivas específicas contra o vírus da rubéola em crianças de Portuga I (n=7)

4. Discussão e Conclusões

Os estudos epidemiológicos são fundamentais para a vigilância e controlo de doenças infecciosas. No entanto, a falta de recursos, as restrições logísticas associadas a colheita de amostras e o seu processamento, são considerados grandes obstáculos para a realização de estudos desta natureza⁽⁶⁸⁾.

Os DBS têm sido utilizados no diagnóstico e monitorização de algumas agentes infecciosos virais como, o HIV, Hepatite A, Hepatite C, entre outros^(59, 65, 68, 77). Estes cartões apresentam inúmeras vantagens para a realização de estudos epidemiológicos em países em vias de desenvolvimento, podendo ser uma alternativa satisfatória aos métodos já existentes. As colheitas para os DBS são realizadas através de punção capilar, um método pouco invasivo, que requer menor quantidade de amostra⁽⁵⁹⁾. Para além disto, a amostra pode ser transportada e armazenada à T.A. até ao seu processamento que pode ser realizado meses após a colheita⁽⁶⁴⁾. Além dos benefícios práticos apresentados anteriormente, os DBS apresentam ainda um baixo custo em comparação com a colheita de sangue para a obtenção de soro (método de referência)⁽⁷⁷⁾.

No presente trabalho procurámos determinar a prevalência das IgGs específicas contra o vírus da rubéola em STP, utilizando os DBS. Uma vez que, este método ainda se encontra pouco padronizado procedemos a uma prévia validação do método de extração das IgGs dos DBS.

Inicialmente, recorremos a dois *kits* comerciais diferentes, SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion) e RUBELLA ELISA IgG (Viricell) de ELISA. As amostras foram processadas recorrendo a cada um dos *kits* com o objetivo de verificar a concordância dos resultados. Após uma comparação dos resultados obtidos foi possível constatar uma conformidade em todos eles. Uma vez que, pretendíamos validar o nosso método de extração de IgGs contra o vírus da rubéola, foi necessário eleger um *kit* que nos fornecesse um resultado quantitativo afim de determinamos parâmetros como a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN, eficiência, linearidade e C.V. inter e intra-

ensaio. Assim sendo, o *kit* seleccionado e utilizado desta fase em diante foi o SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion).

Visando otimizar o processo de extração dos anticorpos IgGs contra o vírus da rubéola, foram utilizados 3 volumes de diluente diferentes e para cada um deles, foram determinados os parâmetros sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e eficiência (tabela13).

Tabela 13- Avaliação dos resultados experimentais obtidos com diferentes diluições no processo de extracção.

Volume de diluição	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	Eficiência (%)
200µl	100	50	95	100	98
400µl	89	100	100	50	75
800µl	72	100	100	29	65

Após a análise dos vários parâmetros avaliados para os diferentes volumes de diluição optamos por escolher o volume de diluição de 400µl. Este volume apresentava em simultâneo, valores de sensibilidade e especificidade mais próximos dos do método de referência (99,1% e 98,9%)⁽⁷⁸⁾. Posteriormente, verificámos que esta diluição apresentava um VPP de 100%. Quanto ao VPN, 50% das amostras negativas não são verdadeiramente negativas, podendo tal facto dever-se aos valores *borderline*. Quanto à eficiência verificamos que 75% dos resultados eram verdadeiramente positivos e negativos.

Para além das determinações realizadas anteriormente, compararam-se ainda os resultados obtidos das IgGs dos DBS, pelo nosso método de extracção, com o estado imunitário de crianças previamente conhecido (vacinadas ou não vacinadas), o que permitia outra aferição do nosso método de extração. Após a análise dos resultados, obtivemos uma sensibilidade de 80%, uma especificidade de 100%, um VPN de 72%, um VPP de 100% e uma eficiência de 86% corroborando os valores anteriormente obtidos.

Os nossos resultados poderiam ter atingido uma força estatística maior se houvesse a possibilidade de recorrer a um maior número de amostras, tal como previsto inicialmente. Em Portugal, todas as crianças são vacinadas contra a rubéola a partir dos 12 meses o que dificultou a obtenção de um maior número de amostras negativas. Para além disto, as crianças elegíveis para o estudo (negativas para IgGs contra o vírus da rubéola) apresentam entre os 9 e os 12 meses de idade o que dificultou a autorização por parte dos pais para obtenção das amostras.

A determinação da linearidade no nosso estudo permitiu-nos verificar se o nosso ensaio tinha a aptidão de produzir resultados directamente proporcionais. Após a análise dos resultados do r^2 concluímos que a maioria das amostras testadas tinha um valor de 0.94 pelo que, podemos afirmar que a metodologia utilizada para a extração das IgGs dos DBSs apresenta uma boa linearidade. No entanto, deve ser realçado que o objectivo primordial da utilização destes cartões em serologia são as avaliações qualitativas, ou seja, a determinação do estado imunitário para um agente infeccioso, neste caso o vírus da rubéola.

Os C.V foram determinados afim de calcular as percentagens de erros intra e inter-ensaio. O C.V. intra-ensaio apresentou uma percentagem de variação entre 0% e 34 % e o C.V. inter ensaio apresentou uma percentagem de variação entre 0% e 77%. Como podemos verificar, observa-se uma grande amplitude de variação para estes C.V. Tal facto pode dever-se à quantidade de amostra não ser exactamente a mesma, uma vez que os 32mm² foram cortados manualmente com uma tesoura e não através de um equipamento que asseguraria a mesma área de cartão. Para além deste facto, poderão ter ocorrido um conjunto de erros associados à realização deste tipo de ensaios, como por exemplo erros na pipetagem.

Apesar de na literatura ser referido⁽¹⁷⁾ que os *kits* de diagnóstico serológico não são adequados para este tipo de amostras, os nossos resultados sugerem que a determinação das IgGs contra o vírus da rubéola nos DBS apresentam uma boa correlação com o método de referência, podendo ser utilizado em estudos de prevalência⁽¹⁷⁾.

Assim sendo, conclui-se que tal prática poderá ser particularmente útil em países onde a imunização contra o vírus da rubéola ainda não faz parte da sua rotina, estimando assim

a prevalência de pessoas infetadas com o vírus da rubéola. Para além disto, facilita também estimar a cobertura vacinal nos países em que o programa de vacinação já foi implementado. Em países com menos recursos, como no caso de STP, torna-se complicado a utilização do método de referência para a determinação das IgGs contra o vírus da rubéola devido à falta de recursos. Os DBS oferecem uma solução simples e eficaz, facilitando a colheita, o transporte e o armazenamento das amostras.

A rubéola é uma doença que pode ser evitável através da vacinação, sendo potencialmente erradicável através de programas de controlo da rubéola⁽⁷⁹⁾. No entanto, países que ainda não introduziram a vacina contra a rubéola, são naturalmente suscetíveis para a aquisição deste vírus. De forma a evitar a infeção pelo vírus da rubéola a OMS recomenda que a introdução da vacina contra a rubéola seja uma prioridade em países com elevadas taxas de prevalência⁽⁷⁹⁾.

Na análise dos resultados do nosso estudo conclui-se que o vírus da rubéola apresenta uma elevada prevalência nos indivíduos entre os 2 e os 35 anos de STP (64%), atestando que as infeções naturais por este vírus ainda são muito comuns no país, o que se deve ao facto de ainda não estar incluída a vacinação rubéola no seu plano de vacinação. Esta taxa de prevalência está de acordo com outros países de África nas mesmas condições; com efeito, vários estudos efectuados em países africanos sugerem que o vírus da rubéola circula livre e amplamente neste continente⁽⁸⁰⁾. Como tal, a distribuição por género não é relevante, uma vez que o vírus infeta na mesma proporção indivíduos do sexo feminino e masculino, o que se verificou no nosso estudo, onde a presença de IgGs contra o vírus da rubéola foi semelhante nos dois géneros.

Dados relativos a outros estudos sugerem que a maioria das crianças tem contacto com o vírus da rubéola até aos 15 anos, desenvolvendo imunidade natural contra a doença⁽⁸⁰⁾. No nosso estudo, verifica-se um aumento progressivo na prevalência de IgGs contra o vírus da rubéola. Tal facto torna-se crucial no caso dos indivíduos do sexo feminino, uma vez que este primeiro contacto pode acontecer durante a gravidez, podendo desenvolver a síndrome da rubéola congénita.

Relativamente à prevalência por regiões, o nosso estudo verificou que Mé zóxi apresentava uma maior prevalência (75%), mas sem diferenças significativas relativamente a outras regiões.

No presente trabalho, foram comparados também os títulos de anticorpos das crianças de STP com os das crianças portuguesas vacinadas. Assim, podemos observar que o nível de anticorpos das crianças de STP, após infecção natural, é mais elevado comparativamente ao nível de anticorpos induzidos pela vacinação, o que está de acordo com a literatura, embora as consequências clínicas e epidemiológicas deste facto ainda não estejam devidamente esclarecidas, uma vez que a eficácia da vacina é elevada, mesmo com níveis mais baixos de anticorpos⁽⁸¹⁾.

De acordo com o CDC e a OMS, a vacina contra a rubéola pode ser administrada em combinação com a vacina da papeira e sarampo, sendo esta preferencialmente administrada aos 12 meses e em seguida aos 5-6 anos. Ainda assim, uma única dose confere em cerca de 95% dos casos uma imunidade de longa duração semelhante à imunidade induzida por uma infecção natural⁽²⁶⁾. Dada a necessidade de controlar a transmissão da rubéola o mais rápido possível e durante a gravidez, a vacinação pode ser sugerida a crianças do sexo feminino entre os 10 e os 12 anos de idade e em mulheres em idade fértil. A vacina contra a rubéola tem-se mostrado eficaz e sem efeitos secundários significativos, pelo que urge que seja implementada o mais rápido possível em STP.

Em suma, com o nosso estudo podemos concluir que é fundamental a introdução da vacina contra a rubéola em STP, pois o vírus da rubéola circula livremente neste país, infectando a maior parte da população em idades jovens. Não se incluía nos objectivos deste estudo a determinação da taxa de infecção congénita por este vírus, mas perante os dados obtidos é de prever que poderá atingir números preocupantes, semelhantes aos observados no hemisfério norte antes das campanhas de vacinação.

Com o nosso estudo concluímos igualmente que os DBS são vantajosos para estudos epidemiológicos, pois, como referido anteriormente, estes foram capazes de determinar IgGs específicas contra o vírus da rubéola, são de fácil colheita, armazenamento e transporte (não necessitam de condições de armazenamento especificais), e

proporcionam a oportunidade de realizar o seu processamento meses após a sua colheita sem perderem fiabilidade.

5. Referências bibliográficas

1. Wesselhoeft C. Rubella (German measles). *N Engl J Med.* 1947;236(26):978-88.
2. Banatvala JE, Brown DW. Rubella. *Lancet.* 2004;363(9415):1127-37.
3. Hamborsky J, Andrew Kroger A, C. W. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases.* 13th ed. Prevention CDC, editor. Washington D.C.2015.
4. Gregg NM. Congenital cataract following German measles in the mother. 1941. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1991;19(4):267-76.
5. Plotkin SA. The history of rubella and rubella vaccination leading to elimination. *Clin Infect Dis.* 2006;43 Suppl 3:S164-8.
6. Parkman PD, Buescher EL, Artenstein MS. Recovery of rubella virus from army recruits. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962;111:225-30.
7. Weller TH, Neva FA. Propagation in Tissue Culture of Cytopathic Agents from Patients with Rubella-Like Illness. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962;111:1.
8. Center for disease control and prevention, Elimination of rubella and congenital rubella syndrome-United States, 1969-2004, 2005. Disponível em <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5411a5.htm>. Consultado a 26/03/2016
9. Castillo-Solorzano C, Marsigli C, Bravo-Alcantara P, Flannery B, Ruiz Matus C, Tambini G, Gross-Gracuos S, Andrus J. Elimination of rubella and congenital rubella syndrome in the Americas. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 2:S571-8.
10. World Health Organization, Global measles and rubella strategic plan 2012-2020, 2012. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44855/1/9789241503396_eng.pdf. Consultado a 2/03/2016
11. Muscat M, Ben Mamou M, Shefer A, Jankovic D, Deshevoy S, Butler R. The State of Measles and Rubella in the WHO European region. *Rev Esp Salud Publica.* 2015;89(4):345-51.
12. Dube M, Rey FA, Kielian M. Rubella virus: first calcium-requiring viral fusion protein. *PLoS Pathog.* 2014;10(12):e1004530.

13. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy, 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol Suppl. 1995;10:1-586.
14. Zhou Y, Ushijima H, Frey TK. Genomic analysis of diverse rubella virus genotypes. J Gen Virol. 2007;88(Pt 3):932-41.
15. Cloete LJ, Tanov EP, Muhire BM, Martin DP, Harkins GW. The influence of secondary structure, selection and recombination on rubella virus nucleotide substitution rate estimates. Virol J. 2014;11:166.
16. Padhi A, Ma L. Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of genotypes 1G and 2B of rubella virus. PLoS One. 2014;9(10):e110082.
17. Lambert N, Strebel P, Orenstein W, Icenogle J, Poland GA. Rubella. Lancet. 2015;385(9984):2297-307.
18. Zheng DP, Frey TK, Icenogle J, Katow S, Abernathy ES, Song KJ, et al. Global distribution of rubella virus genotypes. Emerg Infect Dis. 2003;9(12):1523-30.
19. Dimech W, Grangeot-Keros L, Vauloup-Fellous C. Standardization of Assays That Detect Anti-Rubella Virus IgG Antibodies. Clin Microbiol Rev. 2016;29(1):163-74.
20. Lee JY, Bowden DS. Rubella virus replication and links to teratogenicity. Clin Microbiol Rev. 2000;13(4):571-87.
21. Mangala Prasad V, Willows SD, Fokine A, Battisti AJ, Sun S, Plevka P, et al. Rubella virus capsid protein structure and its role in virus assembly and infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(50):20105-10.
22. Baron MD, Ebel T, Suomalainen M. Intracellular transport of rubella virus structural proteins expressed from cloned cDNA. J Gen Virol. 1992;73 (Pt 5):1073-86.
23. Pasztor K, Orosz L, Seprenyi G, Megyeri K. Rubella virus perturbs autophagy. Med Microbiol Immunol. 2014;203(5):323-31.
24. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York: Garland Science 2001.
25. Lazar M, Pereylygina L, Martines R, Greer P, Paddock CD, Peltecu G, et al. Immunolocalization and Distribution of Rubella Antigen in Fatal Congenital Rubella Syndrome. EBioMedicine. 2016;3:86-92.

26. World Health Organization, Rubella vaccines: WHO position paper, 2011. Disponível em <http://www.who.int/wer/2011/wer8629.pdf>. Consultado a 26/03/2016
27. De Santis M, Cavaliere AF, Straface G, Caruso A. Rubella infection in pregnancy. *Reprod Toxicol*. 2006;21(4):390-8.
28. Signore C. Rubella. *Prim Care Update Ob Gyns*. 2001;8(4):133-7.
29. Best JM. Rubella. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2007;12(3):182-92.
30. Centers for Disease Control and Prevention. Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases, 2012. Disponível em <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt15-crs.pdf>. Consultado a 26/4/2016
31. World Health Organization, Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region 2012. Disponível em: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0018/79020/e93035-2013.pdf?ua=1. Consultado a 25/3/2016
32. Hwang/ SJ, Chen YS. Congenital rubella syndrome with autistic disorder. *J Chin Med Assoc*. 2010;73(2):104-7.
33. Duszak RS. Congenital rubella syndrome-major review. *Optometry*. 2009;80(1):36-43.
34. Dammeyer J. Congenital rubella syndrome and delayed manifestations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2010;74(9):1067-70.
35. Coelho-Castelo AAM, Trombone APF, Rocha CD, Lorenzi JCC. Immune response to infectious diseases. *Medicina*. 2009:127-42.
36. Wandinger KP, Saschenbrecker S, Steinhagen K, Scheper T, Meyer W, Bartelt U, et al. Diagnosis of recent primary rubella virus infections: significance of glycoprotein-based IgM serology, IgG avidity and immunoblot analysis. *J Virol Methods*. 2011;174(1-2):85-93.
37. World Health Organization, Nationwide rubella epidemic-Japan, 2013. Disponível em <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6223a1.htm>. Consultado a 21/03/2016
38. European center for disease prevention and control, Measles and rubella , 2015. Disponível em http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/2015_issue_5_%20Measles%20rubella%20monitoring_final.pdf. Consultado a 21/03/2016

39. Palminha P, Vinagre E, Ribeiro C, Lourenço T, Roque C. Rubéola congénita em Portugal entre 2009 e 2015. *Doenças Infecciosas*. 2015;21-3.
40. Agbede OO, Adeyemi OO, Olatinwo AW. Significance of IgG-Avidity in Antenatal Rubella Diagnosis. *J Family Reprod Health*. 2013;7(3):131-7.
41. Nakayama T. Laboratory diagnosis of measles and rubella infection. *Vaccine*. 2009;27(24):3228-9.
42. Abernathy ES, Hubschen JM, Muller CP, Jin L, Brown D, Komase K, Mori Y, Xu W, Zhu Z, Siquera MM, Shulga S, Tiknova N, Pahmadilok S, Incomerb P, Smit SB, Akoua-koffi C, Bwogi J, Lim WW, Woo GK, Triki H, Jee Y, Mulders MN, de Filippis AM, Featherstone D, Icenogje JP. Status of global virologic surveillance for rubella viruses. *J Infect Dis*. 2011;204 Suppl 1:S524-32.
43. World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, 2007. Disponível em http://www.who.int/ihr/elibrary/manual_diagn_lab_mea_rub_en.pdf. Consultado a 26/03/2016
44. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*. 2005;51(12):2415-8.
45. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*. 2013;133(9):e12.
46. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2005;18(1):21-5.
47. Subtil CL, Vieira M. The beginnings of the organization of the National Vaccination Program in Portugal. *Revista de Enfermagem Referência*. 2011;4:167-74.
48. Mazaba ML, Monze M, Babaniyi OA, Siziya S, Michelo C. Characterization of rubella seronegative females in the zambian blood donor community. *Front Public Health*. 2015;3:59.
49. Goncalves G, Nascimento MS, Reu C, Cutts FT. Levels of rubella antibody among vaccinated and unvaccinated Portuguese mothers and their newborns. *Vaccine*. 2006;24(49-50):7142-7.
50. Direção Geral da Saúde. Normas de vacinação do programa nacional de vacinação Circular Normativa, 26/01/2012. Disponível em: <http://www.dgs.pt/paginas->

de-sistema/saude-de-a-a-z/programa-nacional-de-vacinacao/normas-e-orientacoes.aspx.Consultado a 02/04/2016

51. Andrus JK, de Quadros CA, Solorzano CC, Periago MR, Henderson DA. Measles and rubella eradication in the Americas. *Vaccine*. 2011;29 Suppl 4:D91-6.
52. Vandermeulen C, Mathieu R, Geert LR, Pierre VD, Karel H. Long-term persistence of antibodies after one or two doses of MMR-vaccine. *Vaccine*. 2007;25(37-38):6672-6.
53. Plotkin SA. Rubella eradication. *Vaccine*. 2001;19(25-26):3311-9.
54. Gruner N, Stambouli O, Ross RS. Dried blood spots-preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *J Vis Exp*. 2015(97).
55. Hannelius U, Lindgren CM, Melen E, Malmberg A, von Döbeln U, Kere J. Phenylketonuria screening registry as a resource for population genetic studies. *J Med Genet*. 2005;42(10):e60.
56. Scriver CC. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, by Robert Guthrie and Ada Susi, *Pediatrics*, 1963;32:318-343. *Pediatrics*. 1998;102(1 Pt 2):236-7.
57. Parker SP, Cubitt WD, Ades AE. A method for the detection and confirmation of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots. *J Virol Methods*. 1997;68(2):199-205.
58. McCarron B, Fox R, Wilson K, Cameron S, McMenamin J, McGregor G, et al. Hepatitis C antibody detection in dried blood spots. *J Viral Hepat*. 1999 Nov;6(6):453-6.
59. Desbois D, Roque-Afonso AM, Lebraud P, Dussaix E. Use of dried serum spots for serological and molecular detection of hepatitis A virus. *J Clin Microbiol*. 2009;47(5):1536-42.
60. Limaye AP, Santo Hayes TK, Huang ML, Magaret A, Boeckh M, Jerome KR. Quantitation of cytomegalovirus DNA load in dried blood spots correlates well with plasma viral load. *J Clin Microbiol*. 2013;51(7):2360-4.
61. Johannessen A. Quantification of HIV-1 RNA on dried blood spots. *AIDS*. 2010;24(3):475-6.
62. Parker SP, Cubitt WD. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *J Clin Pathol*. 1999;52(9):633-9.

63. Neto EC, Rubin R, Schulte J, Giugliani R. Newborn screening for congenital infectious diseases. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(6):1068-73.
64. Karapanagiotidis T, Riddell M, Kelly H. Detection of rubella immunoglobulin M from dried venous blood spots using a commercial enzyme immunoassay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;53(2):107-11.
65. Dokubo EK, Evans J, Winkelman V, Cyrus S, Tobler LH, Asher A, et al. Comparison of Hepatitis C Virus RNA and antibody detection in dried blood spots and plasma specimens. *J Clin Virol.* 2014;59(4):223-7.
66. Johannessen A. Dried blood spots in HIV monitoring: applications in resource-limited settings. *Bioanalysis.* 2010;2(11):1893-908.67.
67. Mohamed S, Raimondo A, Penaranda G, Camus C, Ouzan D, Ravet S, et al. Dried blood spot sampling for hepatitis B virus serology and molecular testing. *PLoS One.* 2013;8(4):e61077.
68. Melgaco JG, Pinto MA, Rocha AM, Freire M, Gaspar LP, Lima SM, et al. The use of dried blood spots for assessing antibody response to hepatitis A virus after natural infection and vaccination. *J Med Virol.* 2011;83(2):208-17.
69. Vinikoor MJ, Zurcher S, Musukuma K, Kachuwaire O, Rauch A, Chi BH, et al. Hepatitis B viral load in dried blood spots: A validation study in Zambia. *J Clin Virol.* 2015;72:20-4.
70. Burnett JE. Dried blood spot sampling: practical considerations and recommendation for use with preclinical studies. *Bioanalysis.* 2011;3(10):1099-107.
71. Eick G, Urlacher SS, McDade TW, Kowal P, Snodgrass JJ. Validation of an Optimized ELISA for Quantitative Assessment of Epstein-Barr Virus Antibodies from Dried Blood Spots. *Biodemography Soc Biol.* 2016;62(2):222-33.
72. Ghantous A, Saffery R, Cros MP, Ponsonby AL, Hirschfeld S, Kasten C, Dwyer T, Herceg Z, Hernandez-Vargas H. Optimized DNA extraction from neonatal dried blood spots: application in methylome profiling. *BMC Biotechnol.* 2014;14:60.
73. Lalkhen A, Mc CA. Clinical tests: sensivity and specificity. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain.* 2008;8:221-3.
74. Stockl D, D'Hondt H, Thienpont LM. Method validation across the disciplines-critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(23):2180-90.

75. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S, et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J Chromatogr A*. 2007;1158(1-2):111-25.
76. Robert Koch-Institut, Rubella, 2010 . Disponível em https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Roeteln.html. Consultado a 26/01/2015
77. Smit PW, Sollis KA, Fiscus S, Ford N, Vitoria M, Essajee S, Barnett D, Cheng B, Crowe S, Denny T, Landay A, Stevens W, Habiyarbene V, Perries J, Peeling R. Systematic review of the use of dried blood spots for monitoring HIV viral load and for early infant diagnosis. *PLoS One*. 2014;9(3):e86461.
78. Bula kit SERION ELISA classic Rubella Virus IgG / IgM - Institut Virion\Serion GmbH. Disponível em http://www.virion-serion.de/download/flyer/Flyer_ELISA_classic_Rubella_Virus_EN.pdf. Consultado a 26/10/2014
79. Goodson JL, Masresha B, Dosseh A, Byabamazima C, Nshimirimana D, Cochi S, Reef S. Rubella epidemiology in Africa in the prevaccine era, 2002-2009. *J Infect Dis*. 2011;204 Suppl 1:S215-25.
80. Mirambo MM, Majigo M, Aboud S, Gross U, Mshana SE. Serological makers of rubella infection in Africa in the pre vaccination era: a systematic review. *BMC Res Notes*. 2015;8:716.
81. Vauloup-Fellous C, Ursulet-Diser J, Grangeot-Keros L. Development of a rapid and convenient method for determination of rubella virus-specific immunoglobulin G avidity. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(11):1416-9.

6. Anexos

Anexo 1

Estudo da prevalência das IgGs para o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe com recurso aos “Guthrie cards”: resultados preliminares

Vicente, V; Chasqueira, MJ; Carocha, C; Paixão, P

Introdução:

A rubéola é uma doença viral contagiosa, geralmente benigna que afeta essencialmente crianças. Nas grávidas, a sua transmissão ao feto pode originar a morte deste ou a síndrome da rubéola congénita. A prevalência da rubéola tem diminuído nos países em que foi introduzida a vacina nos planos nacionais de vacinação. Alguns estudos de seroprevalência para outros vírus têm recorrido à utilização dos “Guthrie cards” (DBS), dado que estes são de fácil colheita e armazenamento e requerem quantidades mínimas de amostra de sangue capilar.

Objetivo:

Determinar a prevalência da IgG para o vírus da rubéola numa população de São Tomé e Príncipe, não vacinada para este vírus, recorrendo à utilização dos DBS, validando previamente o método.

Material e Métodos:

População: 56 indivíduos do sexo feminino e 48 do sexo masculino de São Tomé e Príncipe, com idades compreendidas entre 2 e 11 anos. Destes foram colhidos os respetivos DBS (104 no total) entre Janeiro e Maio de 2014.

Método de extração de IgG: eluição de 32 mm² do DBS (1h com agitação a 600 rpm, seguido de 16h/4°C).

Doseamento de IgG: SERION ELISA classic Rubella Virus IgG.

Validação do método: Avaliação da sensibilidade e especificidade (comparação com resultados obtidos com o soro).

Resultados:

Validação do método: sensibilidade: 83%; especificidade: 100%.

Das 104 amostras analisadas 57 foram negativas (<10 UI) , 41 positivas(>20 UI) e 6 borderline (10-20 UI).

Conclusões:

No nosso estudo os DBS mostraram resultados comparáveis com a metodologia de referência, podendo ser utilizados para estudos de vigilância epidemiológica em regiões com recursos laboratoriais limitados. As principais vantagens são: a reduzida quantidade de sangue necessário e as facilidades na colheita, armazenamento e transporte da amostra.

A seroprevalência da rubéola nesta população de crianças de São Tomé e Príncipe foi de 40%, sugerindo que as infeções naturais continuam a ser muito comuns nesta região.

Palavras chave: Rubéola , “Guthrie cards”, prevalência

Anexo 2

Estudo da prevalência das IgGs para o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe com recurso aos “Guthrie cards”

Vicente, V; Chasqueira, MJ; Caroça, C; Paixão, P

Introdução:

A rubéola é uma doença viral contagiosa, geralmente benigna que afeta essencialmente crianças. Nas grávidas, a sua transmissão ao feto pode originar a morte deste ou a síndrome da rubéola congénita.

São Tomé e Príncipe é um dos países onde a vacina para a rubéola ainda não está implementada. Durante Missões Humanitárias em São Tomé e Príncipe verificou-se uma elevada prevalência de surdez, que poderá ter como etiologia a infeção por este vírus. Alguns estudos de seroprevalência para outros vírus têm recorrido à utilização dos “Guthrie cards” (DBS), dado que estes são de fácil colheita e armazenamento e requerem quantidades mínimas de amostra de sangue capilar.

Objetivo:

Determinar a prevalência da IgG para o vírus da rubéola numa população de São Tomé e Príncipe, recorrendo à utilização dos DBS, validando previamente o método.

Material e Métodos:

População: 173 indivíduos do sexo feminino e 143 do sexo masculino de São Tomé e Príncipe, com idades compreendidas entre 2 e 35 anos. Destes foram colhidos os respetivos DBS (316 no total) entre Janeiro e Maio de 2014.

Método de extração de IgG: eluição de 32 mm² do DBS (1h/600 rpm, seguido de 16h/4°C).

Doseamento de IgG: SERION ELISA classic Rubella Virus IgG.

Validação do método: Avaliação da sensibilidade e especificidade (comparação com resultados obtidos com o soro).

Resultados:

Validação do método: sensibilidade: 89%; especificidade: 100%.

Das 316 amostras analisadas 95 foram negativas (<10 UI) , 203 positivas(>15 UI) e 18 borderline (10-15 UI). A prevalência das IgGs contra o vírus da rubéola em São Tomé e Príncipe foi de 65%. Sendo que, a prevalência é semelhante em toda a ilha não havendo nenhum distrito mais afetado.

Conclusões:

No nosso estudo os DBS mostraram resultados comparáveis com a metodologia de referência, podendo ser utilizados para estudos de vigilância epidemiológica em regiões com recursos laboratoriais limitados.

A seroprevalência da rubéola nesta população de São Tomé e Príncipe foi elevada, sugerindo que as infeções naturais continuam a ser muito comuns nesta região, podendo ser responsáveis por alguns dos problemas encontrados nesta população.

Palavras chave: Rubéola , “Guthrie cards”, prevalência

Anexo 3

Rubella is still causing Hearing Loss

Cristina Carocha, Vera Vicente, Paula Campelo, Maria Chasqueira, Helena Caria, Susana Silva, Paulo Paixão, João Paço

Objective

Preventing hearing loss is essential in a community where the prevalence of hearing loss (HL) in children is important. When we found a high prevalence of HL, it is mandatory to identify risk factors. This challenge becomes even more significant when actually some causes can be prevented.

During humanitarian missions, in Sub-Saharan African islands - São Tomé and Príncipe (STP), it was found an increased prevalence of sensorineural hearing loss (SNHL). Routine rubella vaccination is not available in STP and epidemiology and immune status for rubella was never studied in this population. The aim of the study is to assess the immune status of the sample obtained during humanitarian missions in STP islands and also verify if there is any significant association of rubella IgG to HL.

Methods

To this case-control study we had included children from 2 to 14 years old that were observed during humanitarian missions in STP. These children were submitted to audiological evaluation and had accepted to participate in this study. To all had been collected a blood drop to Guthrie card, to detect rubella IgG. Case group included subjects with at least one ear with hearing loss and control group incorporated individuals without hearing impairment. Statistical analysis was performed with IBM SPSS, statistics ver 20.0.

Results

We obtained a sample with 147 subjects from 2 to 14 years. Sixty-eight individuals

(46.3%) had at least one or both ears with SNHL (case group) and 79 (53.7%) were normal hearing (control group). Rubella virus-specific IgG was positive in 50.3% in all sample of 147 subjects. Positive IgG for rubella was present in 44.6% in control group and 55.4% in case group, with statistically significant difference ($p=0,025$). Analyzing by Binary Logistic Regression we verify that rubella is acting as a risk factor and doubles the risk of HL ($p=0.026$; $OR=2.117$ $CI_{95\%}$ [1.094-4.096]).

Conclusions

Even not knowing the time of infection, we conclude that rubella infection exists in STP. There is also a statistically significant association between HL and rubella infection which is acting as a risk factor, almost duplicating the risk of deafness. For this reason, it is urgent to implement rubella vaccine in this country.

Anexo 4

Prevalence of specific IgGs against the study rubella virus in São Tomé and Príncipe with “Guthrie Cards”

Vicente, V; Carocha, C; Chasqueira, MJ; Paixão, P

Introduction: Rubella it's a contagious mild viral disease that usually affects children. In pregnant woman, the fetal spread can origin miscarriage or congenital rubella syndrome. São Tomé e Príncipe is one of the countries where rubella vaccination is not established. Some seroprevalence studies to other viruses have used “Guthrie cards” (DBS), since they are easily collected, readily stored and require minimum quantity of capillary blood.

Objective: Determination of rubella IgG seroprevalence in a São Tomé e Príncipe population using DBS, validating previously this method.

Material and Methods: Population: DBS from 173 females and 143 males from São Tomé e Príncipe (ages between 2 and 35 years) were collected between January and May of 2014.

- IgG extraction method: Elution of 32 mm² DBS (1h/600 rpm, followed by 16h/4°C).

IgG determination: SERION ELISA classic Rubella Virus IgG. Method validation: Sensitivity and specificity were evaluated using the same ELISA technique in serum as reference.

Results: Method validation: Sensitivity: 89%; specificity: 100%.

Of the 316 analyzed samples we obtain 95 negative (<10 UI), 203 positive (>15 UI) and 18 borderline (10-15 UI). The IgG's prevalence against rubella virus in São Tomé e Príncipe was 65%. The prevalence was similar throughout the island.

Conclusions: In our study DBS showed compatible results with the reference method, suggesting that they can be used for epidemiologic surveillance in regions with limited laboratory resources. The high rubella seroprevalence noticed in São Tomé e Príncipe also suggests that natural infections are very common in this area and can be responsible for serious clinical consequences (congenital rubella syndrome) in this population.

Anexo 5

Rubella in Sub-Saharan Africa and sensorineural hearing loss: a case control study

Cristina Caroça, Vera Vicente, Paula Campelo, Maria Chasqueira, Helena Caria, Susana Silva, Paulo Paixão, João Paço

Background

Rubella infection can affect several organs and cause birth defects responsible for the congenital rubella syndrome (CRS). Congenital hearing loss is the most common sequel, occurring about 60% of cases of congenital rubella syndrome. Worldwide, over 100 000 babies are born with CRS every year. There is no specific treatment for rubella but the disease is preventable by vaccination. Since 1969 rubella vaccine have been implemented in some countries preventing this sequel, with efficacy about 95% without significant side effects. To-date, three World Health Organization (WHO) Regions have established goals to eliminate this preventable cause of birth defects. By the end of 2020, WHO pretends to achieve measles and rubella elimination in at least 5 WHO regions. The aim of this study is to evaluate the rubella seroprevalence, find if is statistically significant for hearing loss, to reinforce the need for implementation of the vaccine.

Methods

We collected a convenience sample, with individuals observed during humanitarian missions in São Tomé and Príncipe. All the individuals were underwent audiometric evaluation and was collected a drop of blood to the dried blood spot (DBS). We define two groups: case group (individuals with unilateral or bilateral hearing loss (HL)) and control group (individuals with two normal ears). Patients were excluded if they have conductive HL, evidence of possible causes of HL, developmental delay and who would not participate in the study.

Results

Among the 315 subjects, we found 64.1% individuals with IgG for rubella virus, 32.1% without immunity for rubella and 3.8% were borderline. In control group 62.6% were positive to rubella IgG, whereas in case group was 72%. Analysing both groups of age range from 2 to 14 years of age and more than 15 to 35 years, we found a seroprevalence of 50.3% to rubella in younger group and 82.1 % in the oldest group, with a significant difference between case-control group within the younger group ($p=0.025$).

Conclusions

Rubella is a disease that can be prevented. Most of the Sub-Saharan African countries this vaccine is not implemented. According to the results, it is urgent rubella vaccine in worldwide.

Anexo 6

A)

Estudo da seroprevalência para o vírus da rubéola com recurso aos “Guthrie cards”

FOLHA DE INFORMAÇÃO

Pretende-se com este estudo avaliar a presença dos anticorpos para o vírus da rubéola em duas populações de crianças, vacinadas e não vacinadas para este vírus.

Para as colheitas serão aproveitadas amostras de sangue para análises que foram requisitadas pelos médicos assistentes, de forma que a recolha de sangue neste grupo não implica uma colheita adicional.

Será assegurada, em posterior comunicação ou publicação, a confidencialidade dos dados recolhidos, assim como a identidade dos doentes.

PROTOCOLO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu abaixo assinado (nome completo)
....., representante legal de (identificação completa da criança)
....., nascido a / /,
declaro que autorizo que a amostra de sangue que foi retirada para a realização de análises de rotina possa ser utilizada para um estudo sobre a rubéola.

Lisboa / /

Assinatura:

Anexo 6

B)

Termo de consentimento livre e informado

“O que poderá estar associado à surdez neurosensorial na População de São Tomé e Príncipe?”

O estudo tem por objectivo a elaboração de uma tese para obtenção do grau de Doutor em Otorrinolaringologia, a decorrer na Universidade Nova de Lisboa, sob a orientação do Prof. Doutor João Paço do Centro Clínico e Universitário de Otorrinolaringologia do Hospital CUF Infante Santo – FCML (co-orientadoras: Dra Susana Nunes Silva; Prof. Helena Caria).

Pesquisa: Estabelecer uma relação entre traços de hemoglobinopatias e surdez neurosensorial em São Tomé e Príncipe.

Investigadora: Cristina Paiva Chaves Carocha, Otorrinolaringologista do Centro Clínico e Universitário de Otorrinolaringologia do Hospital CUF Infante Santo - FCML

Objectivo: Recolher os dados de uma amostra de população de São Tomé e Príncipe, com indivíduos dos 2 aos 35 anos.

São realizados testes Audiológicos: Audiograma Tonal e/ou Potenciais Evocados Auditivos. Simultaneamente ao estudo auditivo, será realizada colheita de 4 gotas de sangue para estudo de traço de hemoglobinopatia, viral e genético. Os testes audiológicos consistem na apresentação de sons, através de auscultadores e/ou eléctrodos, que o indivíduo deverá assinalar, ou serão registadas as ondas eléctricas correspondentes à resposta ao estímulo. Os testes audiológicos não são invasivos, não requerem a administração de qualquer fármaco, não provocam qualquer dor ou desconforto ao indivíduo avaliado. A colheita de sangue para papel de filtro será de pequena quantidade, mas poderá ser dolorosa. Eu, abaixo assinado, declaro que tomei conhecimento dos objectivos do trabalho de investigação intitulado “O que poderá estar

associado à surdez neurosensorial na População de São Tomé e Príncipe?” realizado por Cristina Paiva Chaves Caroça, que frequenta o Doutoramento em Otorrinolaringologia da Universidade Nova de Lisboa. Acrescento que estou informado de que todos os dados recolhidos serão tratados de modo estritamente confidencial, aceitando, por isso, fazer parte da amostra do referido trabalho.

Indivíduo < a 18 anos:

Após ter sido devidamente informado, _____, pai/mãe de _____, declaro que tomei conhecimento dos objectivos do estudo e que aceito que o(a) meu (minha) filho(a) colabore no mesmo.

Indivíduo > a 18 anos:

Após ter sido devidamente informado, declaro que tomei conhecimento dos objectivos do estudo e que aceito a minha colaboração no mesmo.

_____(Indivíduo / Representante Legal)

_____(Investigadora / Enfermeiro)

_____, ____ de _____ de 201__

Anexo 7

Tabela 14- Valores obtidos das 316 amostras de STP colhidas entre janeiro e maio de 2014, extraídas dos DBS, e doseadas com o kit SERION ELISA classic Rubella Virus IgG (Virion/Serion).

AMOSTRA	IDADE	SEXO	DISTRITO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO
STP246	2	F	LOBATA	NEGATIVO	5
STP234	2	F	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	6
STP209	2	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	53
STP156	2	F	LOBATA	POSITIVO	29
STP216	2	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	82
STP208	2	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	106
STP212	2	F	LOBATA	POSITIVO	76
STP181	2	M	CAUÉ	POSITIVO	126
STP247	3	F	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	10 / 5
STP142	3	M	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	20 / 12 / 12
STP191	3	M	CANTAGALO	NEGATIVO	7
STP271	3	M	PRÍNCIPE	NEGATIVO	3
STP230	3	M	LOBATA	NEGATIVO	4
STP198	3	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	4
STP231	3	M	LOBATA	NEGATIVO	10 / 4 / 4
STP218	3	M	CANTAGALO	NEGATIVO	9
STP225	3	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	81
STP248	4	F	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	6
STP264	4	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	8
STP206	4	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	8
STP128	4	M	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	7
STP235	4	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	8
STP192	4	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	8
STP315	5	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	3
STP282	5	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	6
STP278	5	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	5
STP122	5	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	55
STP317	5	M	PRÍNCIPE	POSITIVO	180
STP177	6	F	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	11 / 7

Continua na próxima página

Tabela 14-Continuação

AMOSTRA	IDADE	SEXO	DISTRITO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO
STP170	6	F	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	10 / 8
STP199	6	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	5
STP307	6	F	LEMBÁ	NEGATIVO	5
STP207	6	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	10 / 5
STP193	6	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	9
STP136	6	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	9
STP202	6	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	8 / 9
STP217	6	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	313 / 151
STP183	6	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	62
STP184	6	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	68 / 35
STP127	6	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	19 / 16
STP152	6	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	41
STP162	6	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	70
STP173	6	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	76
STP273	6	M	PRÍNCIPE	NEGATIVO	4
STP178	6	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	8
STP182	6	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	176
STP205	6	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	109
STP189	6	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	80
STP272	6	M	PRÍNCIPE	POSITIVO	83
STP195	7	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	9 / 5
STP215	7	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	8
STP304	7	F	LOBATA	NEGATIVO	8
STP185	7	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	68
STP214	7	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	140
STP228	7	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	5
STP239	7	M	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	9 / 4
STP219	7	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	4

Continua na próxima página

Tabela 14- Continuação

AMOSTRA	IDADE	SEXO	DISTRITO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO
STP201	7	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	6
STP120	7	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	7
STP180	7	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	122
STP171	7	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	225
STP164	7	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	15 / 19
STP179	7	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	136
STP203	7	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	102
STP280	7	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	77
STP117	7	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	83
STP316	8	F	LEMBÁ	NEGATIVO	6
STP200	8	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	6
STP118	8	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	7
STP130	8	F	PRÍNCIPE	NEGATIVO	7
STP5	8	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	6
STP125	8	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	73
STP306	8	M	LEMBÁ	<i>BORDERLINE</i>	10 / 4
STP269	8	M	PRÍNCIPE	NEGATIVO	7
STP85	8	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	48 / 34
STP245	9	F	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	9 / 5
STP153	9	F	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	9
STP147	9	F	CANTAGALO	NEGATIVO	8
STP140	9	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	7
STP257	9	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	6
STP84	9	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	107
STP305	9	F	LEMBÁ	POSITIVO	66
STP311	9	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	64
STP187	9	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	8
STP259	9	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	6
STP270	9	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	5
STP281	9	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	67

Continua na próxima página

Tabela 14- Continuação

AMOSTRA	IDADE	SEXO	DISTRITO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO
STP47	10	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	4
STP242	10	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	75
STP86	10	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	26
STP188	10	M	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	11 / 5 / 4
STP166	10	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	7
STP154	10	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	84
STP263	11	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	5
STP302	11	F	CAUÉ	NEGATIVO	9
STP292	11	F	CAUE	NEGATIVO	8
STP7	11	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	5
STP158	11	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	42
STP151	11	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	46
STP144	11	F	PRÍNCIPE	POSITIVO	112
STP222	11	F	LOBATA	POSITIVO	55
STP123	11	M	PRÍNCIPE	POSITIVO	69
STP241	11	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	105
STP240	12	F	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	3
STP295	12	F	CAUÉ	NEGATIVO	3
STP314	12	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	1
STP168	12	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	60
STP261	12	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	70
STP112	12	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	40
STP146	12	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	80
STP267	12	F	PRÍNCIPE	POSITIVO	156
STP119	12	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	4
STP243	12	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	69
STP163	12	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	46
STP134	12	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	129
STP174	13	F	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	10 / 4
STP100	13	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	4
STP303	13	F	CAUÉ	NEGATIVO	4
STP296	13	F	CAUÉ	<i>BORDERLINE</i>	13/ 8
STP289	13	F	CAUÉ	NEGATIVO	4

Continua na próxima página

Tabela 14- Continuação

AMOSTRA	IDADE	SEXO	DISTRITO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO
STP290	13	F	CAUÉ	POSITIVO	46
STP236	13	F	LOBATA	POSITIVO	181
STP284	13	F	CAUÉ	POSITIVO	34
STP106	13	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	153
STP252	13	F	CANTAGALO	POSITIVO	22/ 35
STP175	13	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	93
STP132	13	F	PRÍNCIPE	POSITIVO	79
STP167	13	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	54
STP249	13	M	CANTAGALO	POSITIVO	52
STP253	13	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	34
STP255	13	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	27
STP135	13	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	40
STP160	13	M	CANTAGALO	POSITIVO	30
STP90	13	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	87
STP254	13	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	45
STP250	13	M	CANTAGALO	POSITIVO	53
STP276	13	M	PRÍNCIPE	POSITIVO	52
STP194	14	F	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	11 / 8
STP211	14	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	4
STP51	14	F	LOBATA	NEGATIVO	2
STP294	14	F	CAUÉ	NEGATIVO	2
STP110	14	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	3
STP121	14	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	48
STP143	14	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	29
STP107	14	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	27
STP293	14	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	114
STP18	14	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	11 / 5 / 2
STP285	14	M	CAUÉ	NEGATIVO	4
STP286	14	M	CAUÉ	NEGATIVO	4
STP288	14	M	CAUÉ	POSITIVO	37
STP268	14	M	PRÍNCIPE	POSITIVO	80
STP155	15	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	4
STP226	15	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	4
STP310	15	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	2

Continua na próxima página

Tabela 14- Continuação

AMOSTRA	IDADE	SEXO	DISTRITO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO
STP227	15	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	72
STP232	15	F	LEMBÁ	POSITIVO	67
STP291	15	F	CAUÉ	POSITIVO	64
STP87	15	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	3
STP266	15	M	PRÍNCIPE	NEGATIVO	7
STP287	15	M	CAUÉ	NEGATIVO	4
STP138	15	M	CAUÉ	POSITIVO	41
STP124	16	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	74
STP161	16	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	39
STP139	16	F	LOBATA	POSITIVO	36
STP145	16	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	113
STP275	16	F	PRÍNCIPE	POSITIVO	47
STP76	16	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	3
STP10	16	M	CANTAGALO	NEGATIVO	4
STP148	17	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	74
STP60	17	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	24 / 60
STP141	17	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	3
STP131	17	M	LEMBÁ	POSITIVO	33
STP238	17	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	53
STP75	18	F	CANTAGALO	POSITIVO	25 / 90
STP265	18	F	PRÍNCIPE	POSITIVO	45
STP308	18	F	LOBATA	POSITIVO	70
STP309	18	F	LOBATA	POSITIVO	33
STP220	18	M	CANTAGALO	POSITIVO	103
STP104	18	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	94
STP19	18	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	65
STP20	19	F	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	11 / 9
STP237	19	F	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	16 / 10 / 6
STP4	19	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	44
STP233	19	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	56
STP283	20	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	67
STP101	20	F	CAUÉ	POSITIVO	20 / 61
STP61	20	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	2
STP313	20	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	3

Continua na próxima página

Tabela 14- Continuação

AMOSTRA	IDADE	SEXO	DISTRITO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO
STP223	20	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	70
STP62	20	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	27
STP17	20	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	34
STP42	20	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	36
STP56	21	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	8
STP27	21	F	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	7 / 9
STP43	21	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	33
STP82	21	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	28
STP24	21	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	77
STP244	21	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	66
STP59	21	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	23 / 31
STP30	22	F	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	10 / 6
STP55	22	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	1
STP300	22	F	CAUÉ	NEGATIVO	7
STP256	22	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	111 / 91
STP196	22	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	44
STP73	22	F	CANTAGALO	POSITIVO	36
STP81	22	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	34
STP63	22	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	2
STP96	22	M	CANTAGALO	POSITIVO	60
STP190	23	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	29
STP176	23	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	21 / 15
STP78	23	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	18
STP165	23	M	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	13 / 30
STP14	23	M	CANTAGALO	NEGATIVO	7
STP64	23	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	60
STP28	23	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	20 / 50
STP99	23	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	79

Continua na próxima página

Tabela 14- Continuação

AMOSTRA	IDADE	SEXO	DISTRITO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO
STP1	23	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	87
STP68	23	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	40
STP58	23	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	34
STP169	24	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	47
STP105	24	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	22
STP197	24	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	51 / 54
STP9	24	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	100
STP79	25	F	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	12 / 14
STP70	25	F	CANTAGALO	<i>BORDERLINE</i>	12/ 11
STP11	25	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	6
STP172	25	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	21 / 33
STP49	25	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	60
STP57	25	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	47
STP25	25	M	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	11 / 6
STP12	25	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	61 / 67
STP44	25	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	58
STP95	25	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	81
STP91	26	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	21 / 20
STP159	26	F	LOBATA	POSITIVO	61
STP210	26	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	55
STP52	26	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	35
STP31	26	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	2
STP34	26	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	110
STP13	27	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	2
STP297	27	F	CAUÉ	POSITIVO	66
STP41	27	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	36
STP299	27	F	CAUÉ	POSITIVO	29
STP157	27	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	44
STP69	27	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	158

Continua na próxima página

Tabela 14- Continuação

AMOSTRA	IDADE	SEXO	DISTRITO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO
STP46	27	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	50
STP26	27	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	46
STP37	27	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	19
STP38	28	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	2
STP35	28	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	5
STP54	28	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	31
STP77	28	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	4
STP93	28	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	21 / 27
STP65	28	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	33
STP94	29	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	6
STP229	29	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	173
STP224	29	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	38
STP133	29	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	67
STP53	29	F	CANTAGALO	POSITIVO	34
STP32	29	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	36
STP22	29	F	LOBATA	POSITIVO	48
STP71	29	F	LOBATA	POSITIVO	43
STP36	29	M	MÉ ZÓXI	NEGATIVO	3
STP111	29	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	69
STP109	30	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	23 / 21
STP50	30	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	37
STP113	30	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	30
STP102	30	M	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	14/ 7
STP92	30	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	75
STP116	30	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	86
STP23	30	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	93
STP103	30	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	16
STP3	31	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	35
STP29	31	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	102
STP39	31	F	CANTAGALO	POSITIVO	35

Continua na próxima página

Tabela 14- Continuação

AMOSTRA	IDADE	SEXO	DISTRITO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO
STP8	31	M	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	6
STP129	31	M	LOBATA	POSITIVO	87
STP115	31	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	61
STP186	31	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	57
STP301	31	M	CAUÉ	POSITIVO	32
STP67	31	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	43
STP48	31	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	23
STP2	31	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	33
STP6	32	F	ÁGUA GRANDE	NEGATIVO	9
STP150	32	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	152
STP312	32	F	LOBATA	POSITIVO	49
STP16	32	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	30
STP83	32	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	72
STP21	32	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	86
STP213	32	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	46
STP260	32	M	CANTAGALO	NEGATIVO	8
STP204	32	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	39
STP66	32	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	60
STP279	33	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	42
STP74	33	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	128
STP221	33	F	LOBATA	POSITIVO	54
STP72	33	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	17
STP89	33	M	ÁGUA GRANDE	<i>BORDERLINE</i>	15 / 7
STP262	33	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	76
STP88	33	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	18
STP98	33	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	50
STP298	33	M	CAUÉ	POSITIVO	66
STP258	33	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	87
STP45	34	F	MÉ ZÓXI	POSITIVO	32
STP274	34	F	PRÍNCIPE	POSITIVO	36

Continua na próxima página

Tabela 14- Continuação

AMOSTRA	IDADE	SEXO	DISTRITO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO
STP108	34	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	35
STP15	34	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	49
STP251	34	M	CANTAGALO	POSITIVO	19
STP33	34	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	85
STP114	34	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	38
STP149	35	F	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	73
STP277	35	F	PRÍNCIPE	POSITIVO	21
STP97	35	M	ÁGUA GRANDE	POSITIVO	59
STP40	35	M	MÉ ZÓXI	POSITIVO	95
STP137	35	M	LOBATA	POSITIVO	28