

VAC.II - Padronização da tecnologia multiparamétrica de detecção de níveis de anticorpos induzidos pelos polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* por citometria de fluxo

Denise S. G. Pereira^{1*}; Flávia de Paiva Silva¹; Marta de Almeida Santiago²; Álvaro Luiz Bertho²; Thaize Quiroga²; Fernanda Otaviano Martins¹; Ana Cristina Fonseca Melo¹; Maria de Lourdes Moura Leal¹; Ivna Alana da Silveira¹; Ana Paula dos Santos¹.

1Fiocruz/Bio-Manguinhos;

2Fiocruz/IOC.

Introdução:

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é utilizado para a avaliação da resposta imunológica aos polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A, C e W em vacinas conjugadas combinadas submetidas a ensaios pré-clínicos e clínicos. Além de ser um ensaio laborioso, apresenta uma alta variabilidade (30%) e dependendo do número de análises a serem realizadas, exige uma quantidade considerável de soro do paciente ou camundongo.

Objetivo:

Padronizar um ensaio multiparamétrico por citometria de fluxo, para avaliar a resposta imunológica induzida por esses polissacarídeos conjugados e combinados, bem como comparar os resultados obtidos com o ELISA.

Metodologia:

Um teste de citometria de fluxo baseado em microesferas carboxiladas foi padronizado utilizando soros-padrão *in house* de camundongos, para os polissacarídeos dos grupos A, C e W de *Neisseria meningitidis*; e amostras negativas e positivas, de camundongos suíços imunizados com a vacina meningocócica ACWY conjugada da empresa X. Para padronização desse ensaio, foi realizada uma diluição seriada dos soros padrão (polissacarídeo C e A - 1:250 a 1:32000; polissacarídeo W - 1:100 a 1:12800) e das amostras positivas e negativas (1:400) e calculada a concentração de antígeno ideal para o acoplamento, o *cut-off* do teste e sua correlação com o ELISA. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa FlowJo® e transformados em unidades arbitrárias por mililitros (UA/mL) pelo programa SoftMaxPro (Molecular Devices).

Resultado:

Foi determinada a concentração de antígeno para acoplamento nas microesferas e estabelecidas as etapas do método após uma série de repetições dos soros padrão. As replicatas das curvas do soro-padrão dos três antígenos analisados (PSA, PSC e PSW) não apresentaram diferença estatística significativa, PSA $p=0,4136$, PSC $p=0,1812$ e PSW $p=0,4772$. O *cut-off* do método foi estabelecido para quantificação de anticorpos contra os polissacarídeos (PSC 130,31 UA/mL, PSA 91,65 UA/mL e PSW 319,31 UA/mL) e a quantificação de anticorpos por citometria de fluxo apresentou uma alta correlação com o ELISA (PSC $r=0,992$; PSA $r=0,993$ e PSW $r=0,918$).

Conclusão:

A citometria de fluxo baseada em microesferas tem se mostrado altamente eficiente para quantificação de anticorpos, pois é um método robusto e específico, combinando a sua facilidade e rapidez à alta precisão, sendo muito utilizado para pesquisa clínica. Os resultados para a quantificação do título de anticorpos se mostraram satisfatórios e altamente correlacionáveis com o ELISA, sem a alta variabilidade apresentada pelo método imunoenzimático. A metodologia proposta será de grande importância para a triagem de amostras em ensaios pré-clínicos e clínicos em vacinas combinadas.

Palavras-chave: Citometria de fluxo; Polissacarídeo conjugado; Vacinas