

OTRI4 - Padronização de uma metodologia de ensaio na plataforma de microarranjos líquidos utilizando sífilis como modelo

Periela da Silva Vasconcelos Sousa^{1*}; Christiane de Fátima Silva Marques¹; Bruna de Paula Fonseca e Fonseca¹; Bernardo Oliveira Loureiro¹; Marcelle Bral de Mello¹; Leila Botelho Rodrigues da Silva¹; Nara Mazarakis Rubim¹; Rosa Teixeira de Pinho².

1 - Bio-Manguinhos/ Fiocruz;

2 – IOC.

Introdução:

O ensaio de microarranjos líquidos baseados em microesferas é uma tecnologia recente (difundida a partir do final da década de 1990) e que apresenta certas vantagens em relação às outras, como a análise simultânea de analitos de diversas doenças e logo, uma redução de custo e tempo. Nos três últimos anos, observou-se a crescente demanda de diferentes laboratórios da Fiocruz por essa metodologia, disponível no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED). Considerando esta demanda, avaliamos alguns dos principais parâmetros no ensaio de microarranjos líquidos desde o processo de seleção de proteínas, neste caso, proteínas recombinantes do *Treponema pallidum*, até a configuração do ensaio final e, comparamos o ensaio padrão utilizado no LATED com o ensaio otimizado.

Objetivo:

Utilizar a metodologia desenvolvida para seleção e avaliação de potenciais antígenos para fundamentar a elaboração de um documento interno de Bio-Manguinhos – Instrução de Trabalho (IT) – que possa ser utilizado por profissionais e/ou estudantes que pretendam utilizar a plataforma de microarranjos líquidos para a detecção de agentes patogênicos.

Metodologia:

Foram realizados ensaios de microarranjos líquidos para seleção de proteínas recombinantes. Em seguida, foram avaliados alguns dos principais parâmetros envolvidos na reação. Os parâmetros avaliados foram: velocidade de rotação das microesferas acopladas durante a reação, a temperatura e tempo de incubação durante a reação, o tampão utilizado no ensaio, a diluição das amostras

e do conjugado, bem como conjugado de dois fabricantes, o tempo de assentamento das microesferas ao fundo do poço durante a etapa de lavagem (tempo de soak) e o volume de aspiração durante a leitura das microesferas. Ao final, foram comparados o ensaio padrão utilizado no LATED com o ensaio otimizado.

Resultados:

Testando as proteínas p17, p47, TmpA e quimera verificamos que as p17 e TmpA apresentaram melhor desempenho, ambas com 5 µg de massa de acoplamento às microesferas magnéticas. Alguns parâmetros relacionados à reação foram modificados, tais como o tempo de incubação (de 15 minutos para 40 minutos), o conjugado (a diluição e o fabricante), a diluição da amostra, o tempo de soak e o volume de aspiração na leitura uma vez que apresentaram melhores resultados. Para o protótipo de multiteste padronizado no presente trabalho (utilizando a sífilis como modelo), o formato otimizado (ensaio 2) apresentou maior sensibilidade e especificidade, ou seja, resultados melhores quando comparado ao protocolo padrão (ensaio 1).

Conclusão:

Mesmo com toda a complexidade de padronização de um ensaio múltiplo, conseguimos avaliar alguns dos principais parâmetros e estabelecer as melhores condições para as proteínas selecionadas. Para o protótipo de multiteste padronizado no presente trabalho (utilizando a sífilis como modelo), o formato otimizado (ensaio 2) apresentou resultados melhores quando comparado ao protocolo padrão (ensaio 1).

Palavras-Chave: Microarranjos líquidos, sífilis, diagnóstico