

JAIRO FIGUEIREDO JUNIOR

**RELAÇÃO DE RESULTADOS SOROLÓGICOS DE
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) COM A TÉCNICA
DE IMUNOFLUORESCÊNCIA MICROSCÓPICA
DIGITAL PARA PESQUISA DE ANTIGLOBULINA IGG DE
TOXOPLASMA GONDII**

**Goiânia
2007**

JAIRO FIGUEIREDO JUNIOR

**RELAÇÃO DE RESULTADOS SOROLÓGICOS DE
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) COM A TÉCNICA
DE IMUNOFLUORESCÊNCIA MICROSCÓPICA
DIGITAL PARA PESQUISA DE ANTIGLOBULINA IGG DE
TOXOPLASMA GONDII**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Simões de Albuquerque

Co-orientadora: Prof^a Dra. Cláudia Maria Rassi

**Goiânia
2007**

Dedico este trabalho a DEUS, que está sempre presente em minha vida; à minha esposa Flávia e ao meu filhinho Pedro Felipe, que são as pessoas que mais amo neste mundo; e ao meu pai Jairo e ao meu irmão Marcos, pelos quais qualquer sacrifício vale a pena.

E, em especial, ao Professor Paulão, pelo exemplo de lealdade, companheirismo, determinação e competência; um homem que leva em seu coração bondade, dignidade e respeito ao ser humano, um grande amigo.

Aos professores Luiz Murilo Martins e Sérgio Antonio Machado, os quais por motivos distintos optaram por não fazer o mestrado, dedico todo carinho e admiração.

Ao bolsista Fernando Pucci, pela humildade, competência e lealdade.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por haver me mostrado que, na vida, não se consegue fazer tudo sozinho.

Este trabalho é fruto do esforço conjunto de vários amigos aos quais quero expressar meus agradecimentos:

- ao pessoal do Centro de Referência da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia, por disponibilizar os soros testes;
- ao Laboratório Padrão, por colocar à minha disposição alguns ensaios sorológicos;
- aos Laboratórios Bioshop e Wama, pelos soros controles;
- à Socran, que facilitou o contato com o laboratório Wama;
- ao Departamento de Biomedicina, que viabilizou a realização do projeto;
- ao diretor do LAS, Mauro Mesquita, que em todos os momentos fez tudo o que foi necessário para a realização do projeto;
- ao diretor do LAD, Wilson de Melo, que teve importância fundamental para a concretização da pesquisa;
- aos bolsistas Fernando Pucci, Ana Luiza Medeiros, Clayson Moura e Marcos, sem os quais nada teria acontecido;
- ao meu amigo Ricardo Maranhão, responsável pela Gerência de Incorporação Tecnológica em Saúde/Superintendência Leide das Neves, por ter liberado as horas para realização da pesquisa, e aos amigos Roosevelt, José Fernando, Marcelo Capelli, Ivan Dias, dona Eneila, Sidalmir e Terezinha, por terem realizado o meu trabalho durante minha ausência;
- ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Simões, por sua valiosa contribuição e orientação competente durante todo o processo da pesquisa;
- ao pessoal do fundão, que colaborou bastante para vencermos aquelas aulas “maravilhosas”, e ao Pedro Ludovico, por disponibilizar para a turma algumas fotos e filmes do seu computador para animar as aulas;
- ao Frank, Mauro Zim, Jairo Batista e Pedro Ludovico, por terem tornado divertidos os momentos que compartilhamos.

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório, capaz de infectar uma grande variedade de hospedeiros intermediários, incluindo o homem. No ambiente domiciliar, os hospedeiros definitivos infectados (gatos) eliminam os oocistos pelas fezes, os quais, rapidamente, atingem maturidade no solo e se tornam infectantes. Portanto, a toxoplasmose é adquirida pelo homem por meio da ingestão de oocistos encontrados no meio ambiente domiciliar ou de carnes infectadas com cistos e insuficientemente cozidas. A ocorrência de anticorpos antitoxoplasma tem sido determinada por diversas reações sorológicas, utilizando-se diferentes marcadores sorológicos que possibilitam distinguir infecção recente de toxoplasma-doença. Neste projeto de pesquisa, realizaram-se ensaios sorológicos em que a curva obtida pelo reconhecimento digital de cor, pela técnica de Imunofluorescência Microscópica Digital para Toxo IgG, foi relacionada com os resultados em UI/mL obtidos pela determinação quantitativa de anticorpos IgG para o *Toxoplasma gondii* do sistema VIDAS® Toxo G. Ficou evidenciada a correlação existente entre os soros em UI/mL predeterminados e seus valores encontrados através da equação da curva digitalizada da intensidade de verde. Na comparação entre os soros em UI/mL predeterminados e seus valores encontrados, não foram observadas diferenças que pudessem alterar o diagnóstico clínico-laboratorial. A utilização do conhecimento sobre o comportamento das curvas resultantes das interações das leituras visual e digital demonstra que a proposta deste trabalho é promissora para o desenvolvimento de uma nova forma de análise de imunofluorescência, com significativos ganhos de precisão e redução de preços. A racionalidade não é neutra, portanto o uso racional de tecnologias implica a seleção daquelas que devem ser financiadas e a identificação das condições ou subgrupos em que deverão ser utilizadas com o fim de tornar o sistema de saúde mais eficiente para proteger e recuperar a saúde da população. Com relação ao possível desemprego em empresas envolvidas no processo de modernização tecnológica, o que se espera é que, por meio de políticas públicas em conjunto com a iniciativa privada, sejam desenvolvidas ações no sentido de preparar os trabalhadores para o uso dessas novas tecnologias.

Palavras-chave: Imunofluorescência; microscopia digital; VIDAS® Toxo G.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasite, capable of infecting a large variety of intermediate hosts including humans. In the domiciliary environment, the infected final hosts (cats) spread the oocysts by their excrements, which quickly reach maturity in the ground and become infectants. Therefore, toxoplasmosis is acquired by humans through the ingestion of oocysts found in the domiciliary environment or by eating insufficiently cooked meat, infected with cysts. The antitoxoplasma antibodies presence can be determined by several serologic reactions, using different serologic markers to distinguish recent infection from toxoplasma-illness. In this work, we carried out serologic assays, defined a curve by the digital recognition of color using the Toxo IgG Digital Microscopical Immunofluorescence. The curve was related with the results in UI/ml read by the quantitative determination of IgG antibodies for the *Toxoplasma gondii* of Toxo in the G VIDAS® system. The existing correlation between sera in UI/ml and their values found through the digitalized green intensity curve was evidenced. In the analysis between the predetermined sera in UI/ml and its read values, did not show differences that could affect the laboratorial diagnosis. The analysis of the behavior of the curves defined by this works, shows that the approach adopted by this work is promising. for the development of a novel method for Immunofluorescence analysis with significant gains in precision and price reduction. The rational use of technologies, even so the rationality is not neutral, implies the election of technologies to be financed and the identification of the conditions or sub-groups where they will have to be used, in the direction to become the system of more efficient health for the objective to protect and to recoup the health of the population. Correlation to the unemployment level social impact in companies affected by the technological modernization progress. The expectation is that it has, through public politics in set with private initiative, action for creation of courses that prepare the workers for the use of these new technologies.

Key-words: Immunofluorescence; Digital Microscopical; Toxo G VIDAS®.

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Identificação de anticorpos antitoxoplasma	4
1.2 Objetivos.....	10
1.3 Apresentação da dissertação	10
2. CASUÍSTICA E METODOLOGIA.....	11
2.1 Casuística.....	11
2.2 Metodologia.....	12
2.2.1 Equipamentos utilizados.....	13
2.2.2 Procedimentos	15
2.2.2.1 Titulação em bloco do conjugado/leitura visual.....	16
2.2.2.2 Padronização da leitura digital	17
2.2.2.3 Definição do Protocolo de captura e análise digital de imagens de imunofluorescência.....	19
2.2.2.4 Elaboração da curva de leitura digital	20
2.2.2.5 Determinação da correspondência dos soros testes com a curva digital	20
3 RESULTADOS	21
3.1 Titulação do conjugado em bloco e leitura visual	21
3.2 Definição da curva digital	24
3.3 Resultados dos soros testes.....	26
4 DISCUSSÃO	28
5 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	38
ANEXO A – DOSAGEM DE ANTIGLOBULINA TOXO IgG pelo SISTEMA VIDAS®.....	39
ANEXO B - TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	42
ANEXO C – TABELAS COMPLETAS (7, 10 e 11)	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aparelho miniVIDAS®.

Figura 2 - Microscópio DMLB, Microcâmara digital DC200, Computador Acer Veriton 5100.

Figura 3 - Diluição seriada de uma lâmina de toxo IgG.

Figura 4 – Imagem Fireworks MX V.8 - delimitação de área para recorte.

Figura 5 – Comportamento da curva digital obtida pela leitura da intensidade do verde.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Titulação do conjugado – leitura visual/ A maior diluição do conjugado capaz de identificar 1 UI/mL, utilizando-se o soro com 194 UI/mL

Tabela 2 - Titulação do conjugado – leitura visual / A maior diluição do conjugado capaz de identificar 1 UI/mL, utilizando-se o soro com 195 UI/mL

Tabela 3 - Titulação do conjugado – leitura visual / A maior diluição do conjugado capaz de identificar 1 UI/mL, utilizando-se o soro com 198 UI/mL

Tabela 4 – Titulação do conjugado – leitura visual / A maior diluição do conjugado capaz de identificar 1 UI/mL, utilizando-se o soro com 205 UI/mL

Tabela 5 – Titulação do conjugado – leitura visual / A maior diluição do conjugado capaz de identificar 1 UI/mL, utilizando-se o soro com 208 UI/mL

Tabela 6 – Apresentação da leitura visual positiva para todos os soros

Tabela 7 – Apresentação das leituras digitais / Dados da leitura digital usados para elaboração da equação de relação entre leitura de verde e Unidades Internacionais (UI)

Tabela 8 – Apresentação da leitura visual dos soros testes / Leitura visual positiva para todos os soros

Tabela 9 – Apresentação da leitura visual do soro 299 com suas diluições / Leitura visual positiva até a diluição 1/128

Tabela 10 – Apresentação da leitura digital do soro 299 com suas diluições / Dados da leitura digital usados na equação para averiguar a predição adequada

Tabela 11 - Apresentação da leitura digital do soro 299 com suas diluições / Dados da leitura digital usados na equação para averiguar a predição adequada

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CC	Controle do conjugado
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
ELFA	Enzyme Linked Fluorescent Assay
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FC	Fixação do complemento
IFI	Imunofluorescência indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
JPG	Joint photographic experts group
LAD	Laboratório de apoio didático
LAS	Laboratório da área de saúde
LD	Leitura digital
LV	Leitura visual
MEIA	Imunoensaio Enzimático de Micropartículas
PCR	Polymerase Chain Reaction
UCG	Universidade Católica de Goiás.
UI	Unidade internacional

1 INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório, do filo Apicomplexa (DUBEY; BEATTIE, 1988), capaz de infectar uma grande variedade de hospedeiros intermediários, incluindo o homem (REMINGTON; DESMONTS, 1983). A infestação é geralmente assintomática, mas causa doença ocular significativa em pelo menos 2% a 3% dos pacientes sintomáticos (ROBERTS; McLEOD, 1999). Quando ocorre em situações de ausência de resposta imune efetiva, causa doença devastadora do sistema nervoso central, como em fetos de mães com infecção aguda, em pacientes com AIDS ou submetidos a transplantes, o que pode levar à morte ou a seqüelas significativas (AMATO NETO et al., 1995; REMINGTON et al., 1995). Além disso, a infecção assintomática foi associada, em alguns estudos, a alterações do comportamento humano (FLERG et al., 1996). Por se tratar de uma doença discreta, geralmente assintomática ou com poucas manifestações clínicas, a grande maioria das infecções agudas passa despercebida ao paciente e ao médico. Excetuando-se grupos de risco, como gestantes ou imunossuprimidos, a maioria dos pacientes não recebe terapêutica específica. A transmissão da infecção está relacionada à presença ambiental de felinos, hospedeiros definitivos de um ciclo complexo que envolve todos os animais de sangue quente como hospedeiros intermediários, de aves a golfinhos, passando por todos os animais de produção de carne (DUBEY, 1994; INSKEEP et al., 1990). Esses hospedeiros albergam cistos teciduais latentes por toda a vida, os quais causam mínima doença ao animal, mas completam o ciclo quando se tornam presas de felinos. Estes, após ingerirem os cistos, são infectados e produzem formas ambientais resistentes. Os oocistos eliminados nas fezes, durante as primeiras semanas da infecção, podem permanecer por meses ou anos no ambiente (DUBEY; FRENKEL, 1972) e, ao se aderirem ao pasto, contaminam a água ou os vegetais e infectam os novos hospedeiros intermediários, completando o ciclo. No ambiente domiciliar, os hospedeiros definitivos infectados (gatos) eliminam os oocistos pelas fezes, os quais atingem maturidade rapidamente no solo e se tornam infectantes. Quando ingeridos por hospedeiros intermediários, eles se transformam em taquizoítos e se multiplicam rapidamente com eventual desenvolvimento de cistos que contêm bradizoítos de crescimento mais lento, porém do mesmo modo infectantes. Portanto, a toxoplasmose é adquirida pelo homem mediante a ingestão de oocistos eliminados pelas fezes de gato jovem infectado ou de

carnes infectadas com cistos e insuficientemente cozidas (FRENKEL, 1973; WALLACE; MARSHALL, 1972).

A infecção do adulto sadio é freqüentemente assintomática. Nos casos com manifestação clínica, o mais comum dos sintomas é a linfadenopatia, que pode ser acompanhada de uma série de outros sintomas, dificultando o diagnóstico diferencial (KRICK; REMINGTON, 1978; REMINGTON, 1974). Por outro lado, infecções graves ou fatais ocorrem nos adultos imunocomprometidos por quimioterapia ou por tratamento imunossupressor e em pacientes com AIDS. Acredita-se que as infecções observadas em adultos imunocomprometidos são devidas à reativação de infecções adquiridas latentes e, normalmente, envolvem o sistema nervoso central, embora já tenha sido registrado o envolvimento de outras partes (LUFT, REMINGTON, 1985; LUFT; REMINGTON, 1988; MENDELSON et al., 1987; RUSDIN; REMINGTON, 1976).

A prevalência da toxoplasmose varia de acordo com a localização geográfica, a idade e o sexo da população estudada, as condições de coleta das amostras e pode ainda estar associada a outros fatores. Na Europa, a porcentagem de prevalência na França, na Bélgica, na Áustria e na Itália estende-se de 50% a 85%; na Alemanha, de 50% a 72%; na Espanha, chegam 40% e no Reino Unido, a 20%. Na África, a 50%; no Japão, a 24%; no Irã, a 62%; nos USA, a 39% e no Brasil, estende-se de 50% a 82%.

A transmissão transplacentária do parasito, cuja conseqüência é a toxoplasmose congênita, pode ocorrer durante infecção aguda adquirida pela mãe. O risco de infecção fetal depende da idade gestacional em que a infecção aguda acomete a mãe. Infecções maternas adquiridas logo depois da concepção representam bem pouco ou quase nenhum risco para o feto. Este tipo de transmissão pode ocorrer tanto no momento em que a mãe contrai a infecção como tardiamente. A taxa de transmissão congênita é avaliada em 30% do total das infecções maternas adquiridas durante a gestação. Esse risco cresce do início para o fim da gravidez, chegando a atingir 80% dos fetos quando próximo do termo. Por outro lado, as seqüelas mais graves ocorrem quando a infecção se dá no início da gestação. De fato, quanto mais cedo a infecção acontece, mais graves são as seqüelas. No entanto, vale salientar que, quando é empregado o tratamento materno com a espiramicina, é possível reduzir de 50% a 75% o risco da contaminação fetal (DAFFOS et al., 1989). A maioria das crianças infectadas *in utero* é assintomática ao nascer, especialmente se a infecção materna ocorrer durante o terceiro trimestre da

gestação. As seqüelas, no entanto, aparecerão mais tarde durante o desenvolvimento da criança (DESMONTS; COUVREUR, 1974; DESMONTS; COUVREUR, 1975).

A toxoplasmose congênita é uma doença grave, generalizada ou neurológica, em cerca de 20% a 30% das crianças infectadas. Aproximadamente 10% apresentam apenas uma infecção ocular e o restante (cerca de 70%) é assintomático ao nascer (ALFORD; SAGNO; REYNOLDS, 1975; DESMONTS; COUVREUR, 1975). A infecção subclínica é a forma mais freqüente e atinge a maioria das crianças infectadas durante a segunda metade da gravidez. As lesões fetais graves, em particular as oftalmológicas, não são freqüentes, desde que a infecção seja reconhecida no ato do nascimento e o tratamento seja instituído durante o primeiro ano de vida. Assim, as lesões de retinocoroidite toxoplásmica, que antes chegavam a atingir 60% das crianças com esta forma clínica, hoje não ultrapassam o percentual de 10%.

Estudos prospectivos de gestações demonstraram que o pré-natal reduz a freqüência da gravidade da toxoplasmose congênita (DAFFOS et al., 1988; DESMONTS; COUVREUR, 1974). Durante o período gestacional, 90% a 95% das gestantes que são infectadas pelo *T. gondii* não apresentam qualquer manifestação clínica da doença. Logo, se o médico investigar apenas os casos nos quais haja algum sinal ou sintoma clínico (febre, linfadenopatia, etc.), serão diagnosticados apenas 5% a 10% dos casos de primoinfecção. Considerando-se este aspecto, postula-se a solicitação mensal da sorologia para toxoplasmose para toda gestante não imune à doença (BLANC; BOUBLI; GUILLAUME, 1988; DESMONTS et al., 1985). A soro conversão na gestante é um indicativo de infecção por *T.gondii* e sugere a possível idade gestacional em que ocorreu a infecção materna (DESMONTS; COUVREUR, 1974; DAFFOS et al., 1988; Mc CABE; REMINGTON, 1988).

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose continua sendo um desafio. A toxoplasmose afecção e a toxoplasmose doença, quer no hospedeiro imunocompetente, quer no imunodeficiente, tanto nas formas de linfadenite e coriorretinite toxoplásmicas como na forma de toxoplasmose durante a gravidez, necessitam do diagnóstico clínico presuntivo e da confirmação laboratorial para que seja definida a atividade ou a cronicidade da infecção e, conseqüentemente, sejam instituídas ou não as medidas terapêuticas. Nos hospedeiros imunodeficientes, têm sido utilizados os métodos diretos de demonstração do agente etiológico, como o isolamento em camundongo, a PCR específica, a cultura em tecidos, os exames histopatológicos e histoquímicos e mesmo a tomografia computadorizada e a ressonância magnética. A procura do agente etiológico,

nesses casos, é prioritária. Nos hospedeiros imunocompetentes, assumem primazia no diagnóstico os métodos indiretos, sorológicos, que estudam a resposta humoral específica do organismo contra o agente etiológico. A demonstração de anticorpos IgM, IgA e IgE, específicos anti-*Toxoplasma gondii*, e os testes de avididade da IgG específica auxiliam no diagnóstico de infecção ativa, ao passo que os testes sorológicos que demonstram somente a presença de imunoglobulinas IgG específica, na ausência de marcadores de infecção ativa, indicam a cronicidade ou a latência da infecção.

Atualmente, a metodologia mais utilizada para auxiliar o diagnóstico da toxoplasmose consiste na pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG para que se possa estabelecer a fase da infecção. Porém, já está sendo usada a detecção de IgA (PATEL et al., 1993; STEPICK-BIEK; ARAÚJO; REMINGTON, 1990) como indicador de fase aguda. Diversas técnicas sorológicas já foram empregadas no diagnóstico da toxoplasmose com grande eficiência e rapidez, como, por exemplo, a técnica de Sabin-Feldman (SABINN; FELDMAN, 1948) e a fixação de complemento (FC) (STEPICK-BIEK; ARAÚJO; REMINGTON, 1990). Nos dias atuais, temos imunofluorescência indireta (IFI) (CAMARGO, 1995; DEMNARK; CHESSUM, 1978; SOUNIS, 1979), hemaglutinação (HA) (JACOBS; LUNDE, 1957), *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (CAMARGO; SILVA; LESER, 1976; SANCHEZ; CASTILLO; GRANA, 1985), *immunosorbent agglutination assay* (ISAGA) (ASHBURN et al., 1995; HAJEER; BALFOUR; MOSTRATOS, 1994), Imunoensaio Enzimático de Micropartículas (MEIA) e o método *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA), estes dois últimos considerados como padrão ouro.

1.1 Identificação de anticorpos antitoxoplasma

A ocorrência de anticorpos antitoxoplasma tem sido determinada por diversas reações sorológicas, utilizando-se diferentes marcadores sorológicos de modo que seja possível distinguir infecção recente de toxoplasma-doença. Entre as metodologias desenvolvidas para o diagnóstico da infecção pelo toxoplasma, a primeira foi a clássica reação sorológica de Sabin-Feldman, considerada como padrão ouro. Posteriormente, foi substituída por métodos que permitiam a pesquisa dos anticorpos da classe IgM, além dos anticorpos IgG específicos, como as reações de imunofluorescência indireta (técnica histoquímica ou citoquímica para detecção e localização de antígenos) e as

reações de hemaglutinação passiva com e sem tratamento do soro com 2-mercaptoetanol. A introdução da técnica imunoenzimática (método quantitativo em que a reação Ag-Ac é monitorada por medida da atividade enzimática) de captura para IgM trouxe como vantagem o fato de, além de sensível, ser de execução mais simples. A técnica indireta, utilizando-se conjugado IgM, sofre a interferência do fator reumatóide e da competição dos anticorpos IgG, o que pode dar origem a resultados falso-positivos e falso-negativos. Ambos podem ser afastados pela remoção prévia das IgG da amostra, por absorção com proteína A ou com proteína G, ou por precipitação por meio de um soro anti-IgG. Entretanto, a técnica de escolha tem sido a de captura de IgM. Para este fim, uma placa plástica com cavidades e coberta com anticorpo anti-IgM, geralmente monoclonal, é incubada, sucessivamente, com lavagens intercaladas com o soro a testar, que é um antígeno viral e conjugado antivírus. Esta técnica é de grande sensibilidade, mas podem ocorrer resultados falso-positivos, ainda que menos frequentes do que na técnica indireta. Estes resultados se devem à reação do fator reumatóide capturado com as demais IgM pelo conjugado enzimático. Outra causa de resultados falso-positivos são as reações cruzadas de anticorpos para vírus, como o *Epstein-Barr*, o Citomegalovírus e outros. Pode-se, ocasionalmente, ter um teste de captura de IgM negativo na primeira semana de manifestações clínicas de uma primoinfecção, em virtude do início tardio da produção dos anticorpos IgM. Basicamente, o diagnóstico da infecção pelo toxoplasma é feito pela detecção de anticorpos IgM ou quando a soro conversão é observada entre duas amostras analisadas para a pesquisa de IgG antitoxoplasma. Com a introdução desta nova metodologia, que apresenta especificidade igual à dos métodos anteriores, mas é mais sensível, um paradoxo tornou-se evidente: a presença de uma reação positiva para IgM deixou de ser considerada como marcador de doença aguda, pois, pela maior sensibilidade do método, anticorpos da classe IgM passaram a ser detectados em períodos de 12 ou mais meses do início da infecção.

Muitas pesquisas têm utilizado a imunofluorescência indireta (IFI) para o diagnóstico da toxoplasmose. Diversos pesquisadores (LOGAR; NOVAC-ANTOLIC; ZORE, 1995; LORTER; SANDER, 1992; LUNDE; JACOBS, 1989; LUFT; REMINGTON, 1992; RENOLD; SUGAR; CHAVE, 1992) utilizaram esta técnica nas primeiras 10 a 12 semanas da gravidez; nestes casos as amostras de mulheres com título de IgG igual ou maior que 1.024 foram suspeitas de terem uma infecção recente. A infecção também foi avaliada por meio de anticorpos específicos IgM (KONISHI, 1991). Esses pesquisadores sugeriram também que a dosagem da IFI teria um

importante papel no diagnóstico de toxoplasmose quando somado a outros testes. Outra técnica sugerida é o ensaio de aglutinação para detecção de IgG (ASHBUR et al., 1995), descrito como um ensaio sensível, específico e fácil de se realizar.

Para o diagnóstico definitivo de infecção aguda na gestação, seriam necessários testes seriados para identificar soro conversão materna, quando previamente diagnosticada como suscetível à infecção ou, ainda, mediante a utilização de testes confirmatórios. Um marcador de infecção recente é a baixa afinidade ou avidéz de anticorpos IgG. É um teste simples que pode complementar a definição de um perfil sorológico, especialmente quando insuficientemente delineado pelos demais marcadores sorológicos (CAMARGO; SILVA; LESER, 1991; HEDMAN et al., 1989). Alguns autores consideram que a baixa avidéz de IgG não pode ser interpretada como infecção recentemente adquirida, já que ela pode persistir por mais do que cinco meses dependendo da técnica utilizada. Entretanto, a alta avidéz de IgG, no primeiro trimestre da gestação, virtualmente exclui a infecção recentemente adquirida, o que torna este teste útil no início da gestação. Já a alta avidéz na fase tardia da gestação não exclui infecção adquirida no primeiro trimestre (REMINGTON et al., 2001).

Na fase aguda da toxoplasmose, em geral ocorre primeiramente a produção de imunoglobulina M (IgM), seguida da produção de imunoglobulina G (IgG). A infecção pode também produzir imunoglobulina A (IgA), no caso da transmissão ter ocorrido por via oral. Pela técnica de imunofluorescência com o soro tratado com RF-Absorbente, os anticorpos IgM podem ser dosados uma a duas semanas depois do início da infecção, alcançando um pico em seis a oito semanas, quando então declinam. Títulos baixos podem persistir por mais de 12 meses. O anticorpo IgG persiste por toda a vida na maioria dos pacientes (GOLDSMITH, 1998). Entretanto, nem sempre estes ensaios imunológicos são de fácil interpretação e, por vezes, quando mal interpretados, podem resultar em erros de diagnóstico e, conseqüentemente, em tratamentos inadequados, gastos e estresse desnecessários para o paciente.

Os estudos desenvolvidos para medir a discrepância entre os testes comercialmente disponíveis encontraram mais falhas na detecção de anticorpos IgM (10%) do que de anticorpos IgG (8%). Essa limitação na interpretação dos resultados de IgM se amplia quando os testes são aplicados em população de baixa prevalência de toxoplasmose (HEDMAN; LAPPALAINEN; MAKELA, 1989).

Vários autores (COUTINHO, et al., 1981; JACOBS; LUNDE, 1957; STEPICK-BIEK; ARAÚJO; REMINGTON, 1990), quando compararam as técnicas de IFI, ELISA

e FC, verificaram boa concordância entre os resultados e têm sugerido que a técnica de ELISA, em futuro próximo, poderá substituir a técnica de IFI. Por outro lado, existe relato (VAN KNAPEN, 1984) de que a concordância entre os resultados obtidos por IFI e ELISA não é absoluta. Sugere-se que estas diferenças se devam ao uso de antígenos distintos — íntegros em IFI e solúveis em ELISA (esta última técnica detecta anticorpos de aparecimento mais tardio) —, além da diferença de qualidade entre os fabricantes de conjugados fluorescentes e enzimáticos.

Embora se tenha observado uma correlação direta entre os títulos encontrados entre os testes de IFI e ELISA, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença, o teste de ELISA por captura de IgM tem-se mostrado mais sensível. Usando-se esse teste (HAFID et al., 1995) em pacientes imunocomprometidos, a detecção de antígenos circulantes de *T.Gondii*, capturados por ELISA ou *immunoblotting*, melhora o diagnóstico de infecção toxoplásmica. Utilizando as técnicas de IFI e ELISA para o diagnóstico de encefalite toxoplásmica em pacientes com AIDS (KATLAMA, 1996), verificou-se que cerca de 20% dos pacientes, na fase aguda da doença, apresentaram aumento de IgG. Assim, o método ELISA foi utilizado para confirmar os resultados obtidos por IFI.

Em estudos comparativos (LESER et al., 2005) entre os ensaios feitos pelo sistema AXSYM, baseado na tecnologia de Imunoensaio Enzimático de Micropartículas (MEIA) com imunofluorescência indireta (IFI), para pesquisa de toxo IgG, os resultados obtidos no AXSYM®TOXO IgG foram confirmados por IFI em 93%, ficando demonstrada boa correlação entre as metodologias testadas.

Em outro estudo (REIS et al., 2003), no qual foram comparados os níveis de IgG pela metodologia MEIA, sistema AXSYM®, e pelo método ELFA, sistema VIDAS®, verificou-se que os níveis de IgG pelo ELFA e pelo MEIA não são comparáveis em amostras com valores inferiores a 300 UI/mL, chegando a apresentar níveis de IgG duas a dez vezes mais elevados pelo ELFA comparativamente ao MEIA.

Na tentativa de diminuir as discrepâncias entre os resultados dos testes sorológicos citados anteriormente e verificando a boa correlação entre os resultados obtidos entre os testes IFI e ELISA, estamos propondo uma nova metodologia baseada em estudos apresentados em recente pesquisa (FRANDESCANTONIO, 2005), quando foi realizada a captura e a digitalização de imagens de ensaios de FAN realizados por IFI, relacionando a curva de fluorescência obtida visualmente à curva produzida pelo reconhecimento digital de cor. Esta correlação entre as leituras visuais e as obtidas pelo reconhecimento digital da cor simplifica a realização dos testes. Isso porque reduz o

tempo, a área de reação, o material utilizado e afasta a subjetividade do teste; conseqüentemente, ocorre a queda dos custos, permitindo a utilização da IFI de forma mais ampla no laboratório clínico.

Esta leitura de identificação automática de tonalidades de cores poderia ser utilizada para a transformação de leituras visuais semiquantitativas de toxo IgG por IFI em leituras quantitativas (UI/mL), correlacionando os seus resultados com o sistema AXSYM® toxo IgG ou o sistema VIDAS® toxo IgG.

Do ponto de vista social, o nível de emprego de uma economia é determinado pelo efeito conjunto do crescimento econômico e da introdução de inovações tecnológicas. Não há dúvidas de que a expansão da capacidade produtiva, mantendo-se a mesma tecnologia, tem efeitos positivos sobre o emprego. O mesmo não ocorre, entretanto, com as inovações. As profundas inovações tecnológicas causam grandes alterações e um dos maiores impactos se dá, justamente, no nível de emprego. Esse impacto da tecnologia sobre o emprego depende das características da inovação e da difusão tecnológica, como também da fase do ciclo em que a tecnologia e a economia se encontram. Desse modo, somente a partir de uma análise global do processo de acumulação capitalista é que se pode estudá-lo.

O extraordinário aumento do número de tecnologias produzidas e incorporadas aos serviços de saúde nas últimas duas décadas tem sido associado à queda na mortalidade, claramente evidenciada nas áreas perinatal e cardiovascular, e ao aumento do volume de conhecimento/informação produzido sobre tecnologias médicas e do custo da assistência médica (CUTLER; MCCLELLAN, 2001; LICHTENBERG, 2001).

Por outro lado, problemas na utilização das tecnologias vêm sendo há muito detectados. Alguns estudos não encontraram evidência científica que justificassem procedimentos larga e longamente utilizados ou mostraram grande variação no uso de tecnologias sem qualquer alteração nos resultados (GAO, 1992; GARBER, 2001; WENNERBERG, 1985; WENNERBERG et al., 1988). Em outros casos, ficou demonstrado que tecnologias comprovadamente sem efeito, ou com efeito deletério, continuavam sendo amplamente utilizadas, ao passo que aquelas comprovadamente eficazes apresentavam baixa utilização (ANTMAN et al., 1992). Outro problema bastante freqüente tem sido a utilização de tecnologias fora das condições nas quais se mostraram eficazes (BANTA; LUCE, 1993; PANERAI; MOHR, 1989).

A racionalidade não é neutra, portanto o uso racional de tecnologias implica a seleção daquelas que devem ser financiadas e a identificação das condições ou

subgrupos em que deverão ser utilizadas com o fim de tornar o sistema de saúde mais eficiente para proteger e recuperar a saúde da população. O aumento dos custos da atenção à saúde e a necessidade de subsidiar tecnicamente a seleção de tecnologias a serem financiadas incrementaram, a partir de meados dos anos 80, as atividades de avaliação tecnológica em saúde patrocinadas por governos de países/regiões desenvolvidas.

As relações entre crescimento, tecnologia e emprego vêm sendo fonte de grande interesse acadêmico e, conseqüentemente, fonte de pesquisas em virtude do ressurgimento do desemprego tecnológico gerado pelas mudanças de paradigma produtivo e tecnológico. A mensuração desse impacto, no entanto, não é tarefa fácil e nem isenta de controvérsias.

Desta forma, a finalidade desta pesquisa foi produzir informações complementares que facilitassem e aperfeiçoassem o diagnóstico da toxoplasmose nos serviços de saúde que realizam exames pré-natais.

A segurança de reprodutibilidade dos ensaios com o afastamento de leituras subjetivas, a diminuição de custos operacionais e a transformação de resultados semiquantitativos em resultados quantitativos proporcionam uma melhoria na qualidade do atendimento ao paciente.

Assim, o presente trabalho se propôs a realizar ensaios sorológicos em que a curva obtida pelo reconhecimento digital de cor, pela técnica de Imunofluorescência Microscópica Digital para Toxo IgG fosse relacionada com os resultados em UI/mL obtidos pela determinação quantitativa de anticorpos IgG para o *Toxoplasma gondii* do sistema VIDAS® TOXO G. A escolha do sistema VIDAS® em detrimento do sistema AXSYM® se deveu à disponibilidade do aparelho VIDAS® no laboratório da área de Saúde (LAS) do Departamento de Biomedicina da UCG, onde foi realizada a pesquisa.

1.2 Objetivos

Objetivo Geral

Demonstrar a correlação dos resultados de avaliações semiquantitativas de imunoglobulinas IgG para *Toxoplasma gondii*, pela Técnica de Imunofluorescência Digital, com o método ELFA do sistema VIDAS®.

Objetivos específicos

- Realizar a técnica de IFI e a captura de imagem para digitalização computadorizada, com base em amostras de soro com resultados predeterminados pela técnica do *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA), sistema VIDAS®, com resultados em UI/mL.
- Analisar o resultado da digitalização dos ensaios sorológicos fazendo a correlação entre os testes de IFI e ELFA.
- Estabelecer, mediante a leitura digitalizada, a sua correspondência em UI/mL.

1.3 Apresentação da dissertação

Do ponto de vista da estrutura, este trabalho dissertativo apresenta um capítulo introdutório no qual se mostra a variedade de técnicas laboratoriais para o diagnóstico da toxoplasmose, que muitas vezes trazem dúvidas com relação à interpretação dos resultados; na seqüência, é analisado o impacto social no aumento do desemprego provocado pela modernização tecnológica e se explicitam os objetivos definidos para a realização da pesquisa. No segundo capítulo, intitulado casuística e metodologia, propõe-se uma técnica de análise digital da intensidade de cor para melhorar o desempenho da pesquisa de toxoplasmose IgG. Para este procedimento, são propostas a técnica de imunofluorescência, a captura de imagens, a digitalização de sua intensidade de verde, a elaboração de uma curva digital e, em seguida, a sua correlação de valores em UI/mL. O terceiro capítulo apresenta os resultados encontrados, os quais são discutidos no quarto capítulo. Finalmente, são apresentadas as conclusões do trabalho e tecidas as considerações finais com sugestões para trabalhos futuros.

2. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

Na primeira parte deste capítulo é descrita a casuística e, na segunda, são comentados os procedimentos metodológicos adotados pelo pesquisador.

2.1 Casuística

As áreas do conhecimento envolvidas no trabalho são a computação e a biologia. A associação entre elas forma a Biocomputação, segundo a qual o computador, com seus inúmeros recursos, pode ter uma utilização que vá além daquela de uma máquina de escrever sofisticada. A capacidade de análise digital de cor, forma, medidas de diâmetros, ângulos e áreas é um recurso essencial no laboratório clínico.

As cores se relacionam com a concentração de várias substâncias sanguíneas determinadas na Bioquímica Clínica, como a glicose, fundamental no diagnóstico de diabetes; o colesterol, na avaliação do risco de infarto do miocárdio; a creatinina e a uréia, na função renal e as proteínas, nas desordens nutricionais. Na urina, as cores nos fornecem a medida do pH e dão pistas sobre uma possível contaminação bacteriana. A detecção do urobilinogênio é um indicador precoce de hepatite. A cor pode ainda ser útil para indicar a presença de glicose e de corpos cetônicos na suspeita de diabetes.

Na Imunologia clínica, a intensidade do verde fluorescente nas reações de IFI, verificada na leitura visual, vai diminuindo à medida que a diluição do soro vai aumentando, o que auxilia no diagnóstico de toxoplasmose, chagas, sífilis, clamídia e doenças auto-imunes.

Em Hematologia, a análise de formas nos permite contar células, como leucócitos, hemácias e plaquetas.

No sangue, urina ou liquor, o reconhecimento de curvas eletroforéticas auxiliam no diagnóstico de neoplasias ou desmielinizações.

As aplicações de escalas de cores digitais, como as do sistema RGB, permitem ao computador, equipamento de uso corriqueiro no laboratório, realizar a análise digital de cor e abrem um imenso campo de pesquisa que envolve diminuição de custos, facilidade de deslocamento de análise laboratorial para pontos remotos, além de possibilitar o acesso à tecnologia a populações menos privilegiadas.

2.2 Metodologia

Este trabalho foi realizado mediante o fornecimento do material sorológico pelo Centro de Referência em Terapêutica e Diagnóstico da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia. Foram utilizadas 180 amostras aleatórias de soro de exames realizados para toxoplasmose IgG, com resultados compreendidos entre 0 UI/mL e > 300 UI/mL, dos usuários dos serviços básicos de saúde do município de Goiânia. Foram considerados elegíveis os usuários que entraram nestes serviços de saúde com pedido de exames para toxoplasmose, independentemente de idade, sexo ou outras suspeitas clínicas. O método utilizado por este serviço de saúde para o diagnóstico da toxoplasmose é o MEIA do Sistema Abbott Diagnostics AxSYM® SYSTEM TOXO IgG E IgM. Foram considerados inelegíveis soros de pacientes que não atendiam aos critérios preestabelecidos.

Os soros foram selecionados da soroteca desta unidade, soros estes, armazenados por um período de, no máximo, 60 dias; foi feita uma alíquotagem deste soro para o projeto de pesquisa sem que houvesse prejuízo na quantidade de soro estocado.

O município de Goiânia está dividido em 12 distritos sanitários com suas respectivas unidades de saúde. Cada distrito sanitário possui um laboratório distrital ou um posto de coleta, onde foram realizadas as coletas de sangue e, posteriormente, enviadas para o centro de referência para a realização dos exames sorológicos solicitados em um prazo de 48 horas.

A checagem do soro para o projeto de pesquisa foi realizada conferindo-se o mapa de resultados para toxoplasmose da seção de imunologia com os números de registros dos tubos nos quais estavam acondicionados os soros para a realização dos exames. Estes soros eram guardados em um *freezer*, em tubos de estocagem com tampas de borracha. Após a conferência do material, retirava-se parte do soro para os *eppen dorf*, e estes, devidamente identificados, eram então acondicionados em caixa de isopor com gelo reciclável para serem conduzidos para o laboratório da área de saúde (LAS) da UCG.

No início do projeto, a proposta era usar os valores encontrados pelo sistema AXSYM®, porém surgiram dúvidas com relação à confiabilidade dos resultados, uma vez que o pesquisador não havia acompanhado a realização dos exames. Estas novas

dosagens se fizeram necessárias para que houvesse controle rigoroso de todo o procedimento técnico pelo pesquisador, objetivando, assim, maior rigor científico no andamento da pesquisa. No laboratório da área de saúde (LAS), cada soro das 180 amostras foi dosado apenas uma vez pelo sistema VIDAS®, durante uma semana, dividindo-se o número de amostras entre o período da manhã e o da tarde, evitando-se, desse modo, o descongelamento simultâneo de todos os soros. Com relação aos resultados obtidos pelo sistema VIDAS®, estes não foram comparados com os do sistema AXSYM®, porque, para este trabalho, foi utilizada apenas uma metodologia — o sistema VIDAS®. Os novos resultados foram registrados em mapa de controle e anotados os números dos tubos com os valores obtidos, arquivando-se os resultados impressos pelo aparelho. Os *eppen-dorf* foram acondicionados no *freezer* à temperatura de -80°C e separados por intervalos de resultados, o que evitou os sucessivos processos de congelamento e descongelamento. De acordo com o fabricante do sistema VIDAS®, os intervalos para a interpretação dos resultados são encontrados da seguinte forma: Negativo $< 4\text{UI/mL}$; Zona Cinza $\geq 4\text{UI/mL}$ e $< 8\text{UI/mL}$; Positivo $\geq 8\text{UI/mL}$.

Após essa etapa, foram realizados os testes de imunofluorescência indireta e mais: captura das imagens, digitalização computadorizada das imagens, obtenção da curva digitalizada, correlação dos resultados obtidos por digitalização com os resultados do sistema VIDAS®, análise estatística dos dados e a conclusão.

No caso desta pesquisa em que o material biológico era oriundo do estoque da soroteca do Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica, não houve necessidade da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes, visto que o uso do material sorológico foi autorizado pelo responsável da unidade através de documento, salvaguardando os interesses dos doadores, sua imagem e sua privacidade.

2.2.1 Equipamentos utilizados

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- **miniVIDAS®** - Um sistema automatizado multiparamétrico para imunoanálises que utiliza a tecnologia ELFA - *Enzyme Linked Fluoresce Assay*, combinando a metodologia ELISA com leitura final em fluorescência (Figura 1). É constituído de um módulo analítico multiparamétrico, um computador e uma impressora. O módulo analítico realiza automaticamente todos os estágios das análises,

incluindo a impressão de todos os resultados e contém cinco seções, cada uma aceita seis testes e pode processar mais de 30 amostras simultaneamente. Graças à velocidade de suas reações e à sua arquitetura, VIDAS é o equipamento ideal para manusear uma série de análises e testes de urgência. O módulo do computador é usado para administrar e imprimir os resultados. Assim, ele consegue usar mais de quatro módulos analíticos simultaneamente, dando ao sistema a capacidade de processar 240 exames por hora.



Figura 1 - Aparelho miniVIDAS®.

- **Microscópio DMLB**, marca LEICA (Figura 2), trinocular, com revólver sêxtuplo e com objetivas N Planacromáticas de correção infinita, além de: condensador universal NA1.30 para contraste de fase, campo escuro e campo claro; iluminação transmitida para campo claro de 100watts, acoplada com sistema de fluorescência; lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão com 100watts e filtro BG 38 para o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína.
- **Microcâmara digital DC200**, marca LEICA, para pesquisa e análise de imagens com resolução de 2.64 megapixel, CCD 2/3 de polegada e integração de 18 imagens por segundo.
- **Computador Acer Veriton 5100**. Processador: Petium III – 933 MHz, com disco rígido de 20 MB, placa de vídeo de 4 MB e monitor de 17 polegadas programado para 24 *bytes* de profundidade.
 - Sistema operacional Windows 98
 - Software de captura Leica MI50

- Software de seleção de imagem ACDSee
- Software de processamento de imagem Fireworks MX V.8
- Pacote matemático MATLAB utilizado para implementação dos algoritmos de processamento de imagens
- *Software* de análise estatística SPSS e Excel
- **Tampão PBS (BIOMÉRIEUX)**
- **Azul de Evans (BIOSHOP)**
- **Glicerina tamponada (BIOSHOP)**
- **Lâmina de Toxo G com antígeno (BIOSHOP)**
- **Conjugado Fluoline G (BIOMERIEUX)**



Figura 2 - Microscópio DMLB, Microcâmara digital DC200, Computador Acer Veriton 5100.

2.2.2 Procedimentos

Os procedimentos obedeceram à seguinte seqüência:

1. titulação em bloco do conjugado (anticorpo anti-humano marcado com fluoresceína)/leitura visual;
2. padronização da leitura digital;
3. definição do Protocolo de captura e análise digital de imagens de imunofluorescência;
4. determinação da correspondência dos soros testes com a curva digital.

2.2.2.1 Titulação em bloco do conjugado/leitura visual

No ensaio sorológico para a imunofluorescência, a leitura dos resultados é feita visualmente. É necessário que a leitura visual seja feita antes da padronização da titulação do conjugado (PLOEM, 1970), também conhecida como titulação em bloco. Tal metodologia visa impedir o aumento da concentração do conjugado por um sistema óptico menos potente ou a diminuição de sua concentração por um sistema óptico mais potente, mantendo com isso o mesmo título.

Para se desenvolver esta metodologia, foram selecionadas cinco amostras de valores bem próximos (194, 195, 198, 205 e 208 em UI/mL). Cada um dos soros escolhidos foi diluído com fator comum dois, com diluição inicial de 1/8 e final de 1/2048 com as respectivas dosagens das diluições em UI/mL pela técnica ELFA (Anexo A). Foi também realizada uma diluição seriada de fator comum dois, com diluição inicial de 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 e final 1/32000 do conjugado. Por um período de seis dias consecutivos foram repetidas, diariamente, as titulações do conjugado dos cinco soros em bloco.

As reações de imunofluorescência indireta (Anexo B) foram realizadas segundo as instruções do *kit* da BIOSHOP.

O resultado da leitura visual foi determinado por dois observadores independentes com experiência em leitura de imunofluorescência. Na leitura da lâmina, observou-se uma redução da intensidade do verde fluorescente. O resultado do ensaio corresponde ao título no qual se observou a última imagem fluorescente (Figura 3).

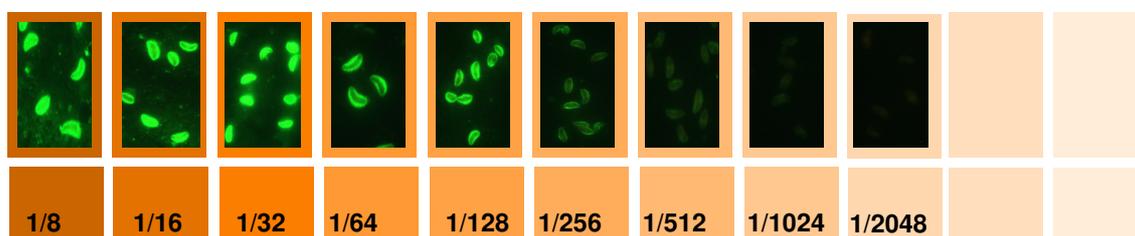


Figura 3 - Diluição seriada de uma lâmina de toxo IgG.

Cruzando-se as diluições do conjugado com o soro e marcando-se com (+) as leituras positivas (tabelas 1, 2, 3, 4 e 5), foi encontrado o maior título do conjugado capaz de identificar 1UI/mL; a variação foi de mais ou menos um título.

Este conjugado padronizado em fluorescência positiva permitiu detectar a queda do título do soro, assegurando a sensibilidade e a reprodutibilidade do ensaio.

2.2.2.2 Padronização da leitura digital

Após a definição do título do conjugado, foram escolhidas as amostras de soro para a realização dos testes. Cada soro escolhido foi diluído com o título de 1/8 e, logo em seguida, realizada a técnica pelo sistema ELFA (Anexo A) para confirmação de seus resultados em UI/mL. Na seqüência, foram realizadas: a técnica de imunofluorescência (Anexo B), a captura das imagens pela câmara do microscópio e a leitura digital com o cálculo das médias da intensidade do teor de verde.

A leitura digital foi padronizada com base na leitura visual da titulação em bloco do conjugado, sendo então definida a sua diluição. Com o conjugado titulado foi efetuada a padronização da câmara de captura.

A leitura digital ocorreu em quatro etapas descritas a seguir:

1. Cada lâmina possuía 12 cavidades (áreas de reação) correspondentes às diluições em título dos soros com suas respectivas UI/ml. Foram capturadas três imagens em JPG de cada cavidade:

a) na captura das imagens, foi focado um campo e, sem alterar este foco, o campo vizinho foi também capturado, evitando-se o decaimento da fluorescência;

b) o momento da captura foi determinado pela barra de marcação do tempo, quando essa havia percorrido a metade de seu trajeto no indicador do *status* de integração com velocidade de 5 *frames/s*.

2. Cada grupo de três imagens foi exposto simultaneamente pelo *software* de seleção de imagem ACDSsee e selecionadas três células de maior padrão de repetição.

3. As imagens selecionadas foram exibidas usando-se o *software* de processamento de imagem *Fireworks* MX V.8. Esse recurso permite fazer recortes nas imagens selecionadas e recortar regiões da membrana do parasito com intensa cor verde. Logo em seguida foi efetuada a escolha de duas imagens mais homogêneas para, posteriormente, serem feitos três recortes de cada imagem, totalizando, assim, seis recortes por cavidade, relativos à diluição do soro. Esses recortes foram feitos em uma região uniforme, evitando-se áreas com falhas ou artefatos (Figura 4). Em caso de imagens com pouco contraste, o

software permite alterá-la, o que foi feito com um aumento de 80% de forma constante em todas as imagens em que o procedimento se fez necessário.

4. O recorte foi analisado em sua cor original, segundo o seguinte algoritmo:

```

Declare S onde s representa o somatório da intensidade
de verde em cada ponto (pixel) da imagem
Inicie s com zero
Leia imagem
Encontre a largura e altura da imagem;
para cada coluna até largura da imagem faça
  para cada linha até altura da imagem faça
    Acumule em s a intensidade de verde do pixel da
    linha e coluna corrente;
  fim para
fim para
pixel_médio = s / (lin*col) // dividido o somatório de
                          // verdes pelo número de
                          // pixels.

```

O software MATLAB, usado para a implementação do algoritmo, transforma o verde em tons de cinza e calcula sua intensidade, encontrando um valor que pode variar entre 0 e 255 (INPE, 2002).

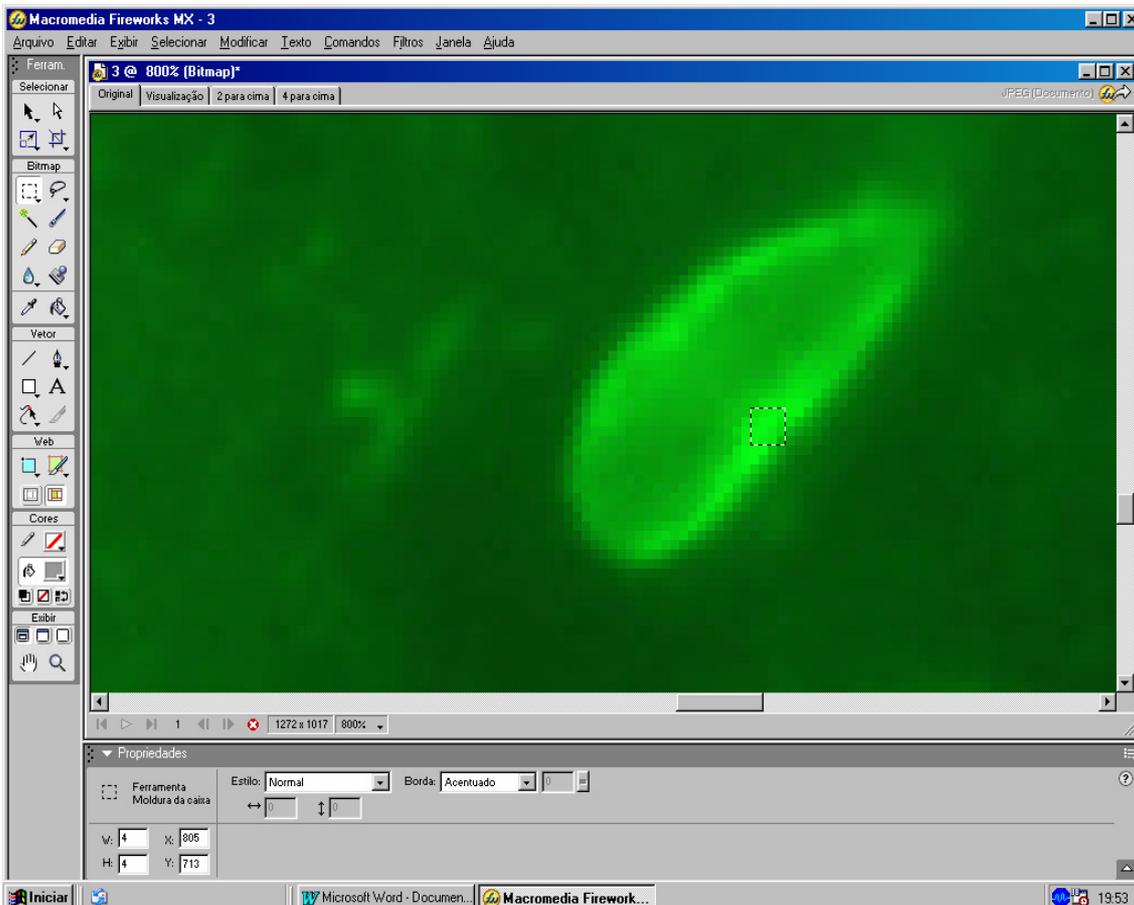


Figura 4 - Imagem *Fireworks* MX V.8 - delimitação de área para recorte.

2.2.2.3 Definição do Protocolo de captura e análise digital de imagens de imunofluorescência

Este protocolo foi realizado observando-se três parâmetros, conforme a descrição a seguir:

1. Padronização da Câmara de Captura

A Microcâmara digital DC200, marca LEICA, com resolução de 2.64 megapixel, CCD 2/3 de polegada e integração de 18 imagens por segundo, usada para captura de imagens em módulo manual, foi calibrada de acordo com Francescantonio (2005), segundo o qual a combinação adequada para a captura das imagens é:

- a) Gama = 2,00
- b) Exposição = 2,99 s
- c) Brilho = 200
- d) Ganho = zero

Nessas condições, a velocidade resultante é de cinco quadros por segundo.

2. Captura

As imagens foram capturadas com a câmara configurada conforme os parâmetros definidos acima e salvas no formato JPEG.

3. Análise

A análise realizada envolveu a medição da intensidade do verde. Após a captura das imagens, os dados foram analisados obedecendo aos oito seguintes passos:

- a) abrir o programa *Macromedia Fireworks MX*;
- b) procurar a imagem desejada;
- c) ajustar tamanho da imagem;
- d) ajustar cor, brilho/contraste, etc., quando for necessário;
- e) recortar a imagem;
- f) salvar a imagem selecionada;
- g) fazer a média da intensidade de cores dos recortes (utilizando algoritmo implementado no pacote Matlab);
- h) enquadrar as médias obtidas com valores predeterminados, em um intervalo significativo de valores dentro da capacidade de leitura do sistema VIDAS para indicar positividade e negatividade.

2.2.2.4 Elaboração da curva de leitura digital

Após a determinação do título do conjugado e a definição da diluição inicial do soro (1/8), foram escolhidos os seguintes soros para a elaboração da curva: 0, 1, 2, 5, 43, 46, 65, 105, 145, 191 e 211 em UI/mL. A escolha desses soros se deveu à possibilidade de formar um intervalo significativo de valores dentro da capacidade de leitura do sistema VIDAS. Logo em seguida, foi realizada a imunofluorescência, a captura e a digitalização das imagens, calculando-se a média da intensidade do verde para cada soro. Desse modo, definiu-se a equação da curva digital.

2.2.2.5 Determinação da correspondência dos soros testes com a curva digital

Para a realização dos testes foram escolhidos os soros 0, 23, 65, 116, 139, 218 e 299 em UI/mL, fazendo-se a diluição dos soros com o título de 1/8, exceto o soro 299 que foi diluído com fator comum dois, com diluição inicial de 1/2 e final de 1/512, obtendo-se os valores 135, 66, 25, 12, 5, 2, 1 e 0 em UI/mL, respectivamente. O objetivo era verificar se havia alguma alteração quando eram feitas diluições com tampão PBS.

O próximo passo foi a realização da imunofluorescência, seguida da captura e da digitalização das imagens, calculando-se a média da intensidade do verde para cada soro e testando-se os resultados com base na equação definida anteriormente.

3 RESULTADOS

Este capítulo apresenta os resultados obtidos nas diversas etapas definidas na metodologia.

3.1 Titulação do conjugado em bloco e leitura visual

No início do planejamento do projeto, definiu-se que, para o experimento, seriam selecionadas 180 amostras aleatórias, com o máximo de 60 dias de armazenamento e resultados dentro dos valores de referência, ou seja, entre 0 e 300 UI/mL, dosados pelo sistema MEIA.

Conforme já foi explicitado na descrição dos procedimentos metodológicos, os soros foram selecionados na soroteca do Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia. Foram considerados elegíveis usuários que entraram nestes serviços de saúde com pedido de exames para toxoplasmose, independentemente de idade, sexo ou outras suspeitas clínicas.

Na primeira etapa da execução da pesquisa, estes soros foram dosados pelo aparelho miniVIDAS (sistema ELFA) do Laboratório da área de saúde da UCG para a confirmação dos seus resultados segundo esta metodologia. No início da segunda etapa, constatou-se a impossibilidade da realização da imunofluorescência porque o estabilizador do microscópio apresentou defeito e, após várias tentativas para consertá-lo, chegou-se à conclusão de que era necessário comprar outro. O processo de compra e entrega do novo equipamento durou mais ou menos um ano, o que acarretou significativo atraso na execução do projeto de pesquisa, que só foi retomado após a entrega e a instalação do novo equipamento. Nesse momento, para confirmar os resultados em UI/mL dos soros anteriormente dosados, foram realizados mais alguns testes, durante os quais se verificou um aumento significativo destes valores. O acréscimo ocorreu em consequência da evaporação dos soros que estavam conservados em tubos de *eppen-dorf* a -80° C, o que ocasionou a concentração dos anticorpos. Este aumento dos resultados inviabilizou a execução do experimento com todas as amostras dosadas anteriormente, pois não tínhamos mais *kits* suficientes para repetir os ensaios sorológicos dessas amostras, uma vez que só restavam mais 58 testes no *kit*. Em consequência disso, decidiu-se por realizar a dosagem de mais 24 amostras do Centro de Referência em Terapêutica e Diagnóstico da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia, com no máximo 60 dias de estocagem e suas diluições pelo sistema VIDAS com valores entre 0 e 300 UI/MmL.

Na segunda etapa, foi realizada a titulação do conjugado em bloco em cinco soros escolhidos com valores bem próximos (194, 195, 198, 205 e 208 em UI/mL), fazendo-se a diluição inicial destes soros com fator comum dois, com o título inicial de 1/2 e título final de 1/512, com as respectivas dosagens das diluições em UI/mL. O conjugado foi diluído com os títulos de 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000, 1/32000 e assim se procedeu à técnica de imunofluorescência indireta por um período de seis dias consecutivos para a determinação do maior valor do conjugado capaz de identificar 1 UI/mL (tabelas 1, 2, 3, 4 e 5). A diluição dos soros se justificava porque, desse modo, seria possível obter resultados que compusessem o intervalo entre 0 e o valor máximo de cada soro. Os valores encontrados se encaixaram dentro da referência do sistema ELFA (negativo <4; zona cinza >= 4 e < 8; positivo >=8).

Tabela 1 - Titulação do conjugado – leitura visual / A maior diluição do conjugado capaz de identificar 1 UI/mL, utilizando-se o soro com 194 UI/mL

DILUIÇÕES DO SORO	UI/ml detectadas	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/1000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/2000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/4000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/8000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/16000
		LV (leitura Visual)	LV	LV	LV	LV
1/8	8	+	+	+	+	+
1/16	3	+	+	+	+	+
1/32	1	+	+	+	+	+
1/64	0	+	+	+	+	-
1/128	0	+	+	+	+	-
1/256	0	+	+	+	+	-
CN		-	-	-	-	-
CP		+	+	+	+	+

Tabela 2 - Titulação do conjugado – leitura visual / A maior diluição do conjugado capaz de identificar 1 UI/mL, utilizando-se o soro com 195 UI/mL

DILUIÇÕES DO SORO	UI/ml detectadas	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/1000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/2000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/4000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/8000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/16000
		LV	LV	LV	LV	LV
1/8	11	+	+	+	+	+
1/16	8	+	+	+	+	+
1/32	3	+	+	+	+	+
1/64	1	+	+	+	+	+
1/128	0	+	+	+	+	-
1/256	0	+	+	+	-	-
CN		-	-	-	-	-
CP		+	+	+	+	+

Tabela 3 - Titulação do conjugado – leitura visual / A maior diluição do conjugado capaz de identificar 1 UI/mL, utilizando-se o soro com 198 UI/mL

DILUIÇÕES DO SORO	UI/ml detectadas	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/1000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/2000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/4000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/8000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/16000
		LV	LV	LV	LV	LV
1/8	10	+	+	+	+	+
1/16	4	+	+	+	+	+
1/32	2	+	+	+	+	+
1/64	1	+	+	+	+	+
1/128	0	+	+	+	+	+
1/256	0	+	+	+	-	-
CN		-	-	-	-	-
CP		+	+	+	+	+

Tabela 4 - Titulação do conjugado – leitura visual / A maior diluição do conjugado capaz de identificar 1 UI/mL, utilizando-se o soro com 205 UI/mL

DILUIÇÕES DO SORO	UI/ml detectadas	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/1000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/2000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/4000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/8000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/16000
		LV	LV	LV	LV	LV
1/8	13	+	+	+	+	+
1/16	8	+	+	+	+	+
1/32	3	+	+	+	+	+
1/64	1	+	+	+	+	+
1/128	0	+	+	+	+	+
1/256	0	+	+	+	-	-
CN		-	-	-	-	-
CP		+	+	+	+	+

Tabela 5 - Titulação do conjugado – leitura visual / A maior diluição do conjugado capaz de identificar 1 UI/mL, utilizando-se o soro com 208 UI/mL

DILUIÇÕES DO SORO	UI/ml detectadas	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/1000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/2000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/4000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/8000	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/16000
		LV	LV	LV	LV	LV
1/8	20	+	+	+	+	+
1/16	8	+	+	+	+	+
1/32	2	+	+	+	+	+
1/64	0	+	+	+	+	+
1/128	0	+	+	+	+	-
1/256	0	+	+	-	-	-
CN		-	-	-	-	-
CP		+	+	+	+	+

3.2 Definição da curva digital

Após a determinação do título do conjugado (1/16000) capaz de identificar 1 UI/ml, visto que com o título de 1/32000 teríamos valores maiores que 1 UI/ml, teve início a terceira etapa com os soros 0, 1, 2, 5, 9, 43, 46, 65, 105, 145, 191, 211 em UI/mL. Foram feitas as diluições dos soros com o título de 1/8, a imunofluorescência (Tabela 6), a captura, a digitalização das imagens e a análise estatística, definindo-se, assim, a equação que determinaria a curva do teor de verde.

Na definição da curva digital foi realizado o teste de regressão (ajuste de curva) dos valores da intensidade do verde (Tabela 7) para a determinação da equação. O comportamento da relação entre a intensidade de verde e as unidades internacionais originou a equação do segundo grau (Figura 5) definida abaixo:

$$\text{Unidade Internacional} = 0,2417\text{verde}^2 - 4,8594 \text{ verde} + 24,773.$$

Tabela 6 – Apresentação da leitura visual positiva para todos os soros

SOROS EM UI/mL	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/16000
	LV
0	+
1	+
2	+
5	+
9	+
43	+
46	+
65	+
105	+
145	+
191	+
211	+
CP	+
CN	-
CC	-

Tabela 7- Apresentação das leituras digitais / Dados da leitura digital usados para elaboração da equação de relação entre leitura de verde e unidades internacionais (UI)

Soro em UI/mL	Intervalo Verde Lido	Intervalo UI/mL Calculado
0	8 – 9	0,6 – 1,4
1	9 – 11	0,3 – 0,6
2	11 – 12	0,6 – 1,3
5	14 – 15	4,1 – 6,3
9	16 – 17	8,9 – 12,0
43	22 – 23	34,8 – 40,9
46	24 – 25	47,4 – 54,4
65	27 – 28	69,8 – 78,2
105	30 – 31	96,5 – 106,4
145	34 – 36	139 – 163,1
191	36 – 38	163,1 – 189,1
211	39 – 41	202,9 – 231,8

Nota - A tabela completa encontra-se no Anexo C.

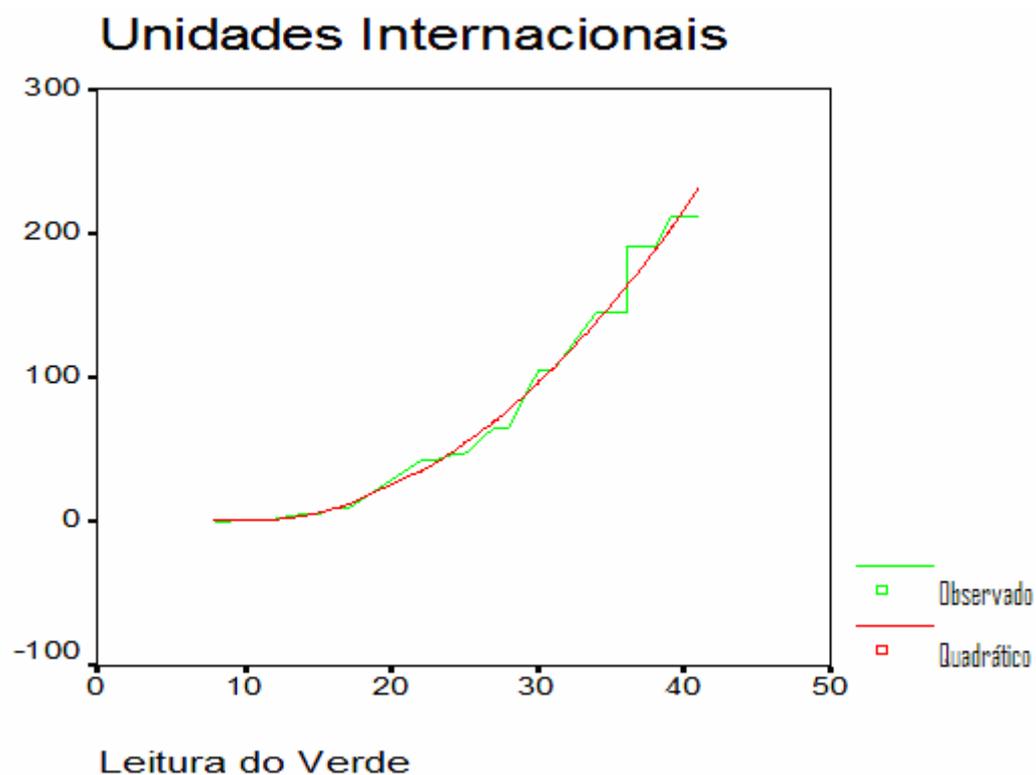


Figura 5 - Comportamento da curva digital obtida pela leitura da intensidade do verde.

3.3 Resultados dos soros testes

Na última etapa, foram realizados os testes com os soros 0, 23, 65, 116, 139, 218 e 299 em UI/mL (Tabela 8), fazendo-se a diluição dos soros com o título de 1/8, exceto o soro 299 que foi diluído com fator comum dois, com diluição inicial de 1/2 e final de 1/512, obtendo-se os valores 135, 66, 25, 12, 5, 2, 1 e 0 em UI/mL, respectivamente (Tabela 9). A justificativa para a diluição do soro de 299 UI/mL de forma diferente foi observar se haveria alguma interferência em seus resultados comparando-se com os resultados de outros soros sem a diluição. Após a realização da imunofluorescência, da captura e da digitalização das imagens para os soros testes (Tabela 10) e do soro 299 (Tabela 11), estes foram testados usando-se a equação encontrada para sua confirmação.

Tabela 8 - Apresentação da leitura visual dos soros testes / leitura visual positiva para todos os soros

SOROS EM UI/mL	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/16000
	Leitura Visual
0,0	+
23	+
65	+
116	+
139	+
218	+
CP	+
CN	-
CC	-

Tabela 9 - Apresentação da leitura visual do soro 299 com suas diluições / leitura visual positiva até a diluição 1/128

DILUIÇÃO DO SORO	UI/mL	DILUIÇÃO CONJUGADO 1/16000
		Leitura Visual
½	135	+
¼	66	+
1/8	25	+
1/16	12	+
1/32	5	+
1/64	2	+
1/128	1	+
1/512	0	-
CP	-	+
CN	-	-
CC	-	-

Tabela 10 - Apresentação das leituras digitais dos soros testes / Dados da leitura digital usados na equação para averiguar a predição adequada.

Soro em UI/mL	Intervalo Verde Lido	Intervalo UI/mL Calculado
0	8 – 10	0,3 – 1,4
23	18 – 21	15,6 – 29,3
65	27 – 30	69,8 – 96,5
116	30 – 32	98,5 – 116,8
139	33 – 36	127,6 – 163,1
218	40 – 42	217,1 – 247,0

Nota: A tabela completa encontra-se no Anexo C.

Tabela 11 - Apresentação da leitura digital do soro 299 com suas diluições / Dados da leitura digital usados na equação para averiguar a predição adequada

Diluições Do soro	Soro em UI/mL	Intervalo Verde Lido	Intervalo UI/mL Calculado
$\frac{1}{2}$	0	8 – 9	0,6 – 1,4
$\frac{1}{4}$	1	9 – 11	0,3 – 0,6
$\frac{1}{8}$	2	11 - 12	0,6 – 1,3
$\frac{1}{16}$	5	13 - 14	2,4 – 4,1
$\frac{1}{32}$	12	17 - 18	12,0 – 15,6
$\frac{1}{64}$	25	20 - 21	24,3 – 29,3
$\frac{1}{128}$	66	28 - 29	78,2 – 87,1
$\frac{1}{256}$	135	33 - 35	127,6 – 150,8

Nota: A tabela completa encontra-se no Anexo C.

4 DISCUSSÃO

A técnica de titulação do conjugado é conhecida como titulação em bloco (PLOEM, 1970) e a leitura da imunofluorescência é realizada visualmente. Para se fazer uma avaliação da curva resultante da interação das leituras visuais e digitais da intensidade do verde fluorescente, é necessária a padronização da leitura visual. As leituras de cada soro, para a padronização do conjugado, foram realizadas visualmente por dois profissionais com experiência em imunofluorescência, por um período de seis dias consecutivos.

A leitura visual feita cruzando-se as duas diluições sugere que o maior título do conjugado para fazer a leitura de 1 UI/mL é de 1/16000, isso ficou demonstrado na Tabela 1, leitura positiva (+) no título 1/32; na Tabela 2, leitura positiva (+) no título 1/34; na Tabela 3, leitura positiva (+) no título 1/64; na Tabela 4, leitura positiva (+) no título 1/64 e na Tabela 5, leitura positiva (+) no título 1/64, porém com valor 0 UI/mL. Este conjugado padronizado em (+) de fluorescência permite detectar, precocemente, a queda de seu título, assegurando a sensibilidade e a reprodutibilidade do ensaio. Foram observados, durante os seis dias, altos níveis de reprodutibilidade e sensibilidade, visto que não houve diminuição do conjugado e a variação do positivo (+) foi de uma diluição a mais ou a menos (entre 1/32 e 1/64), o que está dentro da expectativa da técnica de imunofluorescência e assegura a interpretação clínico-laboratorial.

Nos resultados dos testes para a definição da curva digital, foram comparados os valores em UI/mL *versus* leitura do verde, por meio da análise de variância (ANOVA), obtendo-se $F= 1758,27$ e $p < 0,001$. O que se esperava é que fossem obtidos valores diferentes para o teor de verde, para cada valor em UI. No entanto, conforme se pode ver na Tabela 7, o teste não foi capaz de distinguir alguns valores ($\alpha=0,05$), por exemplo: o valor do verde lido para 0 UI não pode ser distinguido do valor lido para 1 UI; o valor verde lido para 1 UI não pode ser distinguido do valor lido para 0 e 2 UI; o valor do verde lido para 2 UI não pode ser distinguido do valor lido para 1,0 UI; o valor do verde lido para 145 UI não pode ser distinguido do valor lido para 191 UI; o valor do verde lido para 191 UI não pode ser distinguido do valor lido para 145 e 211 UI e o valor do verde lido para 211 UI não pode ser distinguido do valor lido para 191 UI. No entanto, esses resultados não interferem na análise diagnóstica porque eles se mantêm

dentro de cada intervalo dos valores de referência do sistema VIDAS (negativo <4; zona cinza ≥ 4 e < 8; positivo ≥ 8).

Os dados mostraram significativa correlação entre os valores da intensidade de verde e UI. O valor para o r de Pearson foi de 0,951.

A curva que melhor se adequou à relação entre os dados (Tabela 7) foi uma curva de segundo grau (Figura 5) que obedece à equação:

$$\text{Unidade Internacional} = 0,2417\text{verde}^2 - 4,8594 \text{ verde} + 24,773.$$

Os dados utilizados para a obtenção da equação de correlação estão compreendidos entre o intervalo de 0 a 211 UI/mL e os valores de intensidade de verde entre 8 e 41. Assim, a equação é confiável para dados dentro desses intervalos. No entanto, podemos afirmar que, abaixo de uma intensidade de verde de oito unidades, temos resultados negativos e com valores acima de 41 de verde temos resultados positivos. Tais resultados não trazem nenhuma modificação porque eles se mantêm dentro de cada intervalo dos valores de referência do sistema VIDAS. Os demais resultados, apesar de apresentarem diferenças entre o valor do teste e seu valor calculado, todos se mantêm dentro dos intervalos de referência do sistema VIDAS.

Com relação aos soros que foram utilizados como testes para a curva digital, utilizando-se a equação já determinada (tabelas 10 e 11), verificou-se que existe uma considerável correlação entre os dados. Apesar de existir uma diferença de resultado entre o valor do teste e o valor calculado, estes resultados não apresentam nenhuma modificação, porque eles se mantêm dentro de cada intervalo dos valores de referência do sistema VIDAS, portanto não alteram o diagnóstico clínico-laboratorial. Verificou-se também que os resultados obtidos mediante as diluições do soro 299 UI/mL, não apresentaram alterações significativas a ponto de invalidar seus resultados.

Em decorrência do pequeno espaço de tempo para a apresentação do projeto de pesquisa e da dificuldade de encontrar soros com valores entre 4 e 8 UI/mL, ou seja, na zona cinza, realizamos apenas duas dosagens de soros com valores de 5 UI/mL, pois eram o que estavam disponíveis no momento. Os valores da intensidade de verde encontrados em um dos soros ficaram entre 14 e 15, variando entre 4,1 e 6,3 em UI/mL, portanto mantiveram-se dentro da zona cinza. Do outro soro, encontrado a partir da diluição do soro com 299 UI/mL, obtivemos a intensidade do verde entre 13 e 14, variando entre 2,4 e 4,1 em UI/mL, o que indica uma leve tendência a um resultado negativo, ou seja, abaixo de 4 UI/mL.

Ao se analisar os resultados dentro dos valores de referência do equipamento, deve-se levar em consideração que valores abaixo de 8 UI/mL se devem ao pequeno número de anticorpos, o que dificulta a interpretação. Esses valores devem ser considerados junto com a análise clínica da paciente e, necessariamente, deve ser repetida a dosagem com uma nova amostra e solicitado um teste de avidéz de IgG deste soro, principalmente se for uma gestante. Com relação à diferença entre as leituras destes dois soros com 5 UI/mL, independentemente do resultado, o procedimento médico será igual para qualquer um dos soros.

Ficou evidenciado que, em próximas pesquisas, deve-se aumentar o número de soros com valores dentro da zona cinza, o que, certamente, vai assegurar maior rigor científico ao trabalho.

O estabelecimento da correlação entre as curvas de leituras digitais da intensidade do verde e as leituras visuais em UI/mL possibilita a simplificação do teste, resultando em redução do tempo de reação e do material utilizado e na eliminação da subjetividade do observador ao interpretar o resultado. Esse processo de queda do tempo e do preço da reação permite que a técnica seja utilizada de forma mais ampla nos laboratórios clínicos.

5 CONCLUSÃO

No decorrer do desenvolvimento deste trabalho, foram realizados 180 ensaios, utilizando-se as técnicas do *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA), sistema VIDAS®, a imunofluorescência indireta e a imunofluorescência digital.

Ficou evidenciada a correlação existente entre os soros em UI/mL predeterminados e seus valores encontrados por meio da equação da curva digitalizada do teor de verde, utilizando-se, para a sua obtenção, os dados compreendidos no intervalo de 0 a 211 UI/mL e valores de intensidade de verde entre 8 e 41. Esses resultados foram considerados somente para o aparelho miniVIDAS.

Ficou determinado que, para a avaliação da quantidade em UI/mL, é necessária a definição da diluição do soro teste e sua correlação deve ser feita com o teor de verde encontrado.

Na avaliação dos soros em UI/mL predeterminados e seus valores encontrados, não se observaram diferenças que pudessem alterar o diagnóstico clínico-laboratorial, ficando demonstradas a reprodutibilidade e a sensibilidade dos ensaios, o que aumentou a confiabilidade da metodologia.

A utilização do conhecimento do comportamento das curvas resultantes das interações da leitura digital e sua correlação com UI/mL demonstra que a proposta deste trabalho é promissora para o desenvolvimento de uma nova forma de análise de imunofluorescência com significativos ganhos de precisão e redução de preços.

O conhecimento gerado permite prever uma queda significativa no número de diluições, uma vez que, independentemente do valor em UI/mL, será realizada apenas uma diluição. Isso nos permite afirmar que haverá maior rapidez nos ensaios, diminuição dos custos operacionais e maior segurança com relação ao diagnóstico clínico-laboratorial.

Com relação ao impacto social provocado pelo aumento do nível do desemprego, o que se espera é que, por meio políticas públicas em conjunto com a iniciativa privada, sejam desenvolvidas ações para a criação de cursos que preparem os trabalhadores de empresas afetadas pelo processo de modernização tecnológica. Evidencia-se, também, a necessidade de que sejam promovidos, pelo SUS, estudos com base em evidências científicas para discutir a avaliação das tecnologias de saúde e de

seu custo—efetividade, em particular no que diz respeito a planejamento, gerência, difusão e incorporação (financiamento).

Para trabalhos futuros, sugere-se a aplicação desta metodologia para todos os ensaios sorológicos realizados com o aparelho VIDAS e o sistema AXSYM.

REFERÊNCIAS

ALFORD, C.A. J.R.; SAGNO, S.; REYNOLDS, D. W. Toxoplasmosis: Silent Congenital Infection. In: KRUGMANN, S.; GERSHON, A.E. (Edit.). **Infections the Fetus and Newborn Infant**. New York, NY: Alan R. Liss, Inc, 1975. p. 113.

AMATO NETO, V. et al. **Toxoplasmose**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 154 p.

ANTMAN, E.M. et al.. A comparison of results of meta-analyses of randomized control trials and recommendations of clinical experts: Treatments for myocardial infarction. **The Journal of the American Medical Association**, 268(2):240-248, 1992.

ASHBURN, D. et al. Parasitology and human medical preventive importance of *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Pathol**, 48:1.64-69, 1995a.

ASHBURN D. et al. Specificity and usefulness of a IgE immunosorbent agglutination assay for toxoplasmosis. **Journal of Clinical Pathology**, 48:64-69, 1995b.

BANTA, H.D. ; LUCE, B.R. **Health care technology and its assessment: an international perspective**. New York: Oxford University Press, 1993.

BLANC, B. ; BOUBLI, L. ; GUILLAUME, H. Toxoplasmose et grossesse. In: SEMINARE SUR LE DIAGNOSTIC PRÉNATALE. **Trabalhos apresentados...** Montpellier, set., 1988.

CAMARGO, M.E.; LESER, P.G.; LESER, W.S.P. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. A comparative study of hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM-immunofluorescence tests in 3752 serum samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 18:215-226, 1976.

CAMARGO, M.E. et al. Avidity of IgG specific antibodies as markers of recent primary infection by *Toxoplasma gondii*. **Inst Méd Trop São Paulo**, São Paulo, 33:213-8, 1991.

CAMARGO, M.E. Alguns aspectos atuais do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose. **Anais da Academia Nacional Medicina**, 155:236-239, 1995.

COUTINHO, S.G. et al. Levantamento dos resultados das reações de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em 6079 pacientes de ambulatório ou gestantes no Rio de Janeiro realizadas durante o exame de 1970-1977. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 23:48-56, 1981.

CUTLER, D.M.; McCLELLAN, M. Is technological change in medicine worth it? **Health Affairs**, 20(5):11-29, 2001.

DAFFOS, F. et al. Prenatal Management of 746 Pregnancies At Risk for Congenital

Toxoplasmosis. **N Engl J Med**, 318:271, 1988.

DAFFOS, F. et al. Diagnostic prenatal de la toxoplasmose congénitale. In: DEUXIEME JOURNEE D'ENSEIGNEMENT DE MEDECINE ET BIOLOGIE FOETALES. **Anais...** La Clusaz, 1989.

DENMARK, J.R.; CHESSUM, B.S. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and detection of Toxoplasma antibody. **Medical Laboratory Science**, 35:227-232, 1978.

DESMONTS, .G, COUVREUR, J. Congenital Toxoplasmosis. A prospective Study of 378 Pregnancies. **N Engl J Méd**, 290:1110, 1974.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. Toxoplasmosis: Epidemiologic and Serologic Aspects of Prenatal Infection. In: KRUGMANN, S.; GERSHON, A.E. (Edit.) **Infections of the Fetus and Newborn Infant**. New York: Alan R. Liss, Inc. 1975. p.115.

DESMONTS, G. et al. **Prenatal diagnostics of congenital toxoplasmosis**. *Lancet*, 1985, i:500-504.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 205 (11), 1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P., BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man**. Boca Raton (Flórida): CRC Press,Inc, 1988. 220p.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst Induced Toxoplasmosis in cats. **J. Protozool.**, 19: 155-177, 1972.

FLERG, J. et al. Induction of Changes in human behavior by the parasitic ptozoan Toxoplasma gondii. **Parasitol.**, 113: 49-54, 1996.

FRANDESCANTONIO, P. L. C. **Comportamento das curvas resultantes da interação das leituras visuais e digitais na triagem de auto-anticorpos (Fan) pela Imunofluorescência Indireta**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde da Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2005.

FRENKEL, J.K. Toxoplasma in and Around Us. **Bioscience**, 23:343, 1973.

GAO/USA (United States General Accounting Office/Program Evaluation and Methodology Division). **Report to congressional requesters. Cross design synthesis: a new strategy for medical effectiveness research**. Washington: US Government Printing Office, 1992. Document GAO/PEMD-92-18.

GARBER, A.M. Evidence-based coverage policy. **Health Affairs**, 20(5):62-82, 2001.

GOLD, M.R. et al. Identifying and valuing outcomes. In: **Cost-effectiveness in health and medicine**. New York: Oxford University Press, 1996. p. 82-134.

GOLDSMITH, R.S. Infectious Diseases: Protozoal & Helminthic. In : **Current Medical Diagnosis & Treatment**. 37th. ed. Stamford, COnecticut (USA): Appleton & Lange, 1998.

HAFID, J. et al. Detection of circulating antigens of *Toxoplasma gondii* in human infection. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.** 52 . 336-9, 1995.

HAJEER, A.H. et al. *Toxoplasma gondii*: detection of antibodies in human saliva and serum. **Parasite Immunology**, 16:43-50, 1994.

HEDMAN, K. et al. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. Infect Dis**, 159:736-40, 1989.

INSKEEP, W. et al. Toxoplasmosis in atlantic bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*). **J. wildlife Dis.**, 26 (3): 377-382, 1990.

JACOBS, J.; LUNDE, M.N. A hemagglutination test for toxoplasmosis. **Journal of Parasitology**, 43:308-314, 1957.

KATLAMA, C. Diagnosis and Treatment of toxoplasmosis of the CNS. In: **Patients with AIDS**. CNS Drugs, 5.5.331-33, 1996.

KONISHI, E. Naturally occurring immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* in Japanese populations. **Parasitology**, 102:157-62, 1991.

KRICK, J.Á., REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in the Adult-Na Overview. **N. Eng. J. Med**, 298:550, 1978.

LESER, P.G. et al. **Significado da baixas concentrações de anticorpos IgG antitoxoplasma obtidos nos ensaios realizados no AXSYM TOXO IgG**. Instituto Fleury de ensino e pesquisa, 2005.

LICHTENBERG, F. Are the benefits of newer drugs worth their costs? Evidence from the 1996 MEPS. **Health Affairs**, 20(5):241-251, 2001.

LOGAR, J; NOVAC-ANTOLIC, Z; ZORE,A. Sorological Screening for Toxoplasmosis in Pregnancy in Solvenia. **Scand. J. Infect. Dis**, 27.163-4, 1995.

LORTER, S. , SANDER M.A. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immuno-deficiency syndrome. **N.Engl.J.Med**, 327.1693-8, 1992.

LUFT, B.J., REMINGTON, J.S. Toxoplasmic Encephalitis. **J Infect Dis**, 157:1, 1988.

LUFT, B.J.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis of the Central Nervous Sistem. **Curr Clin Top Infect Dis**, 6:316, 1985.

LUFT, B.T, REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis. **J. Infect. Dis**, 157.1-6, 1992.

LUNDE, M.N. , JACOBS, L. Antigenic differences between endozoites and cystozoites defined by monoclonal antibodies. **Parasitology Research**, 75:189-3, 1989.

Mc CABE, R.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis: The Time Has Come. **N Engl J Med**,318:313, 1988.

MENDELSON, M.H. et al. Pulmonary Toxoplasmosis in AIDS. **Scand J Infect Dis**, 19:703, 1987.

PANERAI, R.B.; MOHR, J.P. **Health technology assessment methodologies for developing countries**. Washington: Pan American Health Organization, 1989.

PATEL, B. et al. Immunoglobulin-A detection and investigation of clinical toxoplasmosis. **Journal of Medical Microbiology**, 38:286-292,1993.

REIS, M.M. et al. **Toxoplasmose na Gestação-Comparação dos níveis de IgG entre o ELFA, sistema VIDAS, Biomerrieux, e o MEIA, sistema AXSYM, Abbot**. Mm Porto Alegre: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 2003.

REMINGTON, J.S., DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O. (Edit.) **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. Philadelphia: WB Sanders, 1983. p. 143.

REMINGTON, J.S. et al. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O. (Edit.) **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 5th. ed. Philadelphia: WB Saunders: 2001. p. 205-346.

REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in the Adult. **Bull N Y Acad Méd**, 50:211, 1974.

REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O. **Infectious diseases of fetus & newborn infant**. 4th. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. p. 140-267.

RENOLD, C.; SUGAR, A.; CHAVE, J.P. Toxoplasmic encephalitis. **Medicine**, 7:224-238, 1992.

ROBERTS, F.; McLEOD, R. Pathogenesis of Toxoplasmic Retinochoroiditis. **Parasitol. Today**, 15 (2): 51-57, 1999.

RUSDIN, J., REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in the Compromised Host. **Ann Intern Med**, 84:193, 1976.

SABIN, A.B.; FELDMAN, H.A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (Toxoplasma). **Science**, 108:660-663,1948.

SÁNCHEZ, R.M., CASTILLO, F.C., GRANA, J.P. Comparación de ELISA com lãs técnicas de imunofluorescencia indirecta y fijación del complemento para el diagnóstico de la toxoplasmosis. **Revista Cubana Medicina Tropical**, 37:269-277, 1985.

SOUNIS, E. **Bioestatística**, 2. ed. São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil, 1979.

STEPICK-BIEK, P. et al. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, 162:270-273, 1990.

VAN KNAPEN, F.V. Immunodiagnosis of Toxoplasmosis. Drudderij Veenman BV, Wagenigen, 1984.

WALLACE, G.D.; MARSHALL, L.; MARSHAL, M. Cats, Rats and Toxoplasmosis on a Small Pacific Island. **AM J Epidemiol**, 95:475, 1972.

WENNBERG, J.E.,. On patient need, equity, supplier-induced demand, and the need to assess the outcome of common medical practices. **Medical Care**, 23(5):512-520, 1985.

WENNBERG, J.E., et al. An assessment of prostatectomy for benign urinary tract obstruction: geographic variations and the evaluation of medical care outcomes. **The Journal of the American Medical Association**, 259: 3.027-3.030, 1988.

ANEXOS

**ANEXO A – DOSAGEM DE ANTIGLOBULINA TOXO IgG pelo
SISTEMA VIDAS®**

Dosagem de Anticorpo Toxo IgG pelo sistema VIDAS®

O princípio de dosagem associa o método imunoenzimático sandwich de anticorpo em duas etapas com uma detecção final em fluorescência (ELFA).

O cone de utilização única serve tanto de fase sólida como de sistema de pipetagem. Os outros reagentes da reação imunológica estão prontos para serem usados e pré-repartidos na barrete.

Todas as etapas do teste são efetuadas automaticamente no aparelho. São constituídas por uma sucessão de ciclos de aspiração e dispensação do meio reacional.

Numa primeira etapa a amostra é diluída, depois aspirada e dispensada no interior do cone. Os anticorpos Anti- *T.gondii* IgG presentes na amostra vão fixar-se aos antígenos *T.gondii* fixados no interior do cone. As etapas de lavagem eliminam os componentes não fixados. Na segunda etapa, as IgG monoclonais (rato) anti-IgG humanas conjugadas com fosfatase alcalina são aspiradas e dispensadas no interior do cone e vão ligar-se às IgG humanas fixadas no antígeno. Durante a etapa final de revelação, o substrato (4-Metil-umbeliferilfosfato) é aspirado e depois dispensado no cone; a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato num produto (4-metil-umbeliferona) cuja fluorescência emitida é a 450nm. O valor do sinal de fluorescência é proporcional à concentração do anticorpo presente na amostra. Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente pelo aparelho em relação a uma curva de calibração memorizada e impressos.

Realização do teste

1. Tirar do freezer apenas os reagentes necessários, deixá-los 30 minutos à temperatura ambiente antes de utilizá-los.
2. Utilizar uma barrete “TXG” e um cone “TXG” para cada amostra, controle ou calibrador a testar. Verificar se a saqueta/sachet de cones está bem fechada após cada utilização.
3. Digitar ou seleccionar “TXG” no aparelho para introduzir o código do teste. O calibrador identificado obrigatoriamente por “S1”, deve ser utilizado em

duplicata. Se o controle positivo tiver de ser testado, será identificado por “C1”. Se o controle negativo tiver de ser testado, será identificado por “C2”.

4. Homogeneizar em vortex o calibrador, os controles e as amostras.
5. Distribuir 100µl de calibrador, de amostra ou de controle no poço-amostra.
6. Colocar no aparelho os cones e as barretes. Verificar a concordância dos códigos (cores e letras) entre o cone e a barrete.
7. Começar a análise (consultar o Manual de Utilização). Todas as etapas são geridas automaticamente pelo aparelho. Os resultados obtêm-se em, aproximadamente, 40 minutos.
8. Terminada a análise, retirar os cones e os barretes do aparelho.
9. Eliminar os cones e os barretes utilizados num recipiente apropriado.
10. Leitura de resultados.

ANEXO B - TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Técnica de imunofluorescência indireta

Os ensaios de anticorpos fluorescentes utilizam o método indireto de marcação de anticorpo por conjugados marcados com isotiocianato de fluoresceína.

O procedimento é realizado em duas etapas.

Na primeira etapa, o soro humano a ser testado entra em contato com o substrato antigênico fixado na lâmina. O anticorpo, se presente no soro teste, irá se ligar ao antígeno, formando um complexo antígeno-anticorpo. Se o soro a ser testado não contém anticorpo para este antígeno particular, não é formado nenhum complexo e todos os componentes do soro são retirados durante a lavagem.

Na segunda etapa ocorre a adição de um anticorpo anti-humano marcado com fluoresceína(conjugado) nas cavidades de teste. Se o complexo antígeno anticorpo específico é formado na primeira etapa, o anticorpo marcado com fluoresceína irá se ligar ao anticorpo do complexo na segunda etapa. Uma reação positiva, verde maçã fluorescente brilhante, pode ser vista com a ajuda de um microscópio de fluorescência.

Preparo da lamina de imunofluorescência indireta.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- a) Inicialmente os reagentes, lâminas e soros a serem utilizados, devem ser retirados do Freezer 15 minutos antes da realização do teste para que adquiram a temperatura ambiente.
- b) Lâminas e Glicerol: Prontos para o uso.
- c) PBS: Dissolver o conteúdo de um pacote em 1 litro de água destilada ou deionizada do tipo 2. Fechar o recipiente para prevenir contaminação ou evaporação.
- d) Controles: os soros controles, soro humano testado, foram cedidos pela empresa WAMA com título 1/128.
- e) Conjugado: frascos contendo 2,0 mL do conjugado puro da marca Fluoline G (BIOMÉRIEUX).

- f) Azul de Evans : Frasco contendo Azul de Evans em pó, que deve ser diluído de acordo com a titulação do conjugado juntamente com o conjugado.

PROCEDIMENTO

Para obter ótimos resultados as cavidades do substrato não devem secar enquanto se executa o teste.

- a) Remover as lâminas e os reagentes requeridos do refrigerador e deixe-os atingir a temperatura ambiente (15 a 30 minutos)
 - b) Remova as lâminas da embalagem apenas antes do uso e as rotule.
 - c) Diluir a amostra utilizada com tampão PBS pH 7,4 \pm 0,2 preparando uma diluição seriada de fator comum dois com um título inicial de 8 e título final de 8192
 - d) É necessário testar
- I. Controle Negativo
- II. Controle de conjugado(PBS)
- e) Cobrir cada poço com 20 μ l das respectivas diluições .
 - f) Incubar em uma câmara úmida a 23 °C \pm 2°C por 30 minutos.
 - g) Enxaguar as lâminas rapidamente com tampão PBS, não jogar tampão direto nos poços.
 - h) Enxaguar as lâminas completamente por 7 minutos em um suporte de coloração com PBS. Trocar o tampão e lavar adicionalmente por 8 minutos. Manusear as lâminas levemente. É necessário uma leve agitação do tampão para uma eficiente lavagem da lamina.
 - i) Enxugar a cobertura pintada da lamina com os mata- borrões. Não permitir que as cavidades sequem antes da adição do conjugado.
 - j) 10.Diluir o conjugado na diluição determinada na titulação do conjugado
 - k) Cubra cada poço com uma gota (10 μ l) do Conjugado.
 - l) Incube em câmara úmida a 23 °C \pm 2 °C por 30 minutos. Proteja da luz intensa.
 - m) Repetir os passos g e h. Enxugar a cobertura pintada da lâmina com os mata-borrões. Não permitir que as cavidades sequem antes da adição de glicerol.

- n) Colocar uma pequena gota do Glicerol Tamponado em cada poço a cobrir com uma lamínula.

Para melhores resultados, as lâminas deverão ser lidas em um aumento de 1000X, e, preferencialmente, no término da reação; caso necessite de uma leitura posterior, conservar a lâmina na geladeira (2- 8 °C).

ANEXO C – TABELAS COMPLETAS (7, 10 e 11)

Tabela 7 - Apresentação das leituras digitais / Dados da leitura digital usados para elaboração da equação de relação entre leitura de verde e Unidades Internacionais (UI).

U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro
0	8	1,4	1,4	1	10	0,3	0,7	2	12	1,3	0,7
0	8	1,4	1,4	1	11	0,6	0,4	2	11	0,6	1,4
0	8	1,4	1,4	1	11	0,6	0,4	2	12	1,3	0,7
0	9	0,6	0,6	1	9	0,6	0,4	2	12	1,3	0,7
0	9	0,6	0,6	1	10	0,3	0,7	2	12	1,3	0,7
0	8	1,4	1,4	1	10	0,3	0,7	2	11	0,6	1,4
U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro
5	14	4,1	0,9	9	16	8,9	0,1	43	22	34,8	8,2
5	14	4,1	0,9	9	17	12,0	3,0	43	23	40,9	2,1
5	15	6,3	1,3	9	16	8,9	0,1	43	22	34,8	8,2
5	14	4,1	0,9	9	17	12,0	3,0	43	23	40,9	2,1
5	14	4,1	0,9	9	17	12,0	3,0	43	22	34,8	8,2
5	14	4,1	0,9	9	16	8,9	0,1	43	22	34,8	8,2
U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro
46	24	47,4	1,4	65	28	78,2	13,2	105	30	96,5	8,5
46	25	54,4	8,4	65	27	69,8	4,8	105	30	96,5	8,5
46	25	54,4	8,4	65	27	69,8	4,8	105	31	106,4	1,4
46	24	47,4	1,4	65	28	78,2	13,2	105	31	106,4	1,4
46	24	47,4	1,4	65	27	69,8	4,8	105	30	96,5	8,5
46	25	54,4	8,4	65	27	69,8	4,8	105	30	96,5	8,5
U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro
145	35	150,8	5,8	191	37	175,9	15,1	211	39	202,9	8,1
145	35	150,8	5,8	191	38	189,1	1,9	211	40	217,1	6,1
145	36	163,1	18,1	191	38	189,1	1,9	211	41	231,8	20,8
145	36	163,1	18,1	191	36	163,1	27,9	211	40	217,1	6,1
145	34	139,0	6,0	191	36	163,1	27,9	211	39	202,9	8,1
145	36	163,1	18,1	191	38	189,1	1,9	211	39	202,9	8,1

Tabela 10 - Apresentação das leituras digitais dos soros testes / Dados da leitura digital usados na equação para averiguar a predição adequada

U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro
0	9	0,6	0,6	23	20	24,3	1,3	65	29	87,1	22,1
0	9	0,6	0,6	23	19	19,7	3,3	65	28	78,2	13,2
0	10	0,3	0,3	23	21	29,3	6,3	65	27	69,8	4,8
0	8	1,4	1,4	23	19	19,7	3,3	65	28	78,2	13,2
0	10	0,3	0,3	23	18	15,6	7,4	65	29	87,1	22,1
0	8	1,4	1,4	23	19	19,7	3,3	65	30	96,5	31,5
U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro
116	32	116,8	0,8	139	35	15,8	11,8	218	42	247,0	29,0
116	31	106,4	9,6	139	33	127,6	11,4	218	40	217,1	0,9
116	31	106,4	9,6	139	36	163,1	24,1	218	41	231,8	13,8
116	32	116,8	0,8	139	35	150,8	11,8	218	42	247,0	29,0
116	30	98,5	19,5	139	33	127,6	11,4	218	41	231,8	13,8
116	32	116,8	0,8	139	33	127,6	11,4	218	41	231,8	13,8

Tabela 11 - Apresentação da leitura digital do soro 299 com suas diluições / Dados da leitura digital usados na equação para averiguar a predição adequada

U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro
0	9	1,6	0,6	1	10	0,3	0,7	2	11	0,6	1,4
0	8	1,4	1,4	1	10	0,3	0,7	2	12	1,3	0,7
0	8	1,4	1,4	1	10	0,3	0,7	2	11	0,6	1,4
0	9	0,6	0,6	1	11	0,6	0,4	2	12	1,3	0,7
0	8	1,4	1,4	1	9	0,6	0,4	2	12	1,3	0,7
0	9	0,6	0,6	1	11	0,6	0,4	2	12	1,3	0,7
U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro
5	13	2,4	2,6	12	18	15,6	3,6	25	20	24,3	0,7
5	14	4,1	0,9	12	18	15,6	3,6	25	21	29,3	4,3
5	13	2,4	2,6	12	18	15,6	3,6	25	21	29,3	4,3
5	14	4,1	0,9	12	17	12,0	0,0	25	20	24,3	0,7
5	13	2,4	2,6	12	18	15,6	3,6	25	20	24,3	0,7
5	14	4,1	0,9	12	17	12,0	0,0	25	21	29,3	4,3
U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro	U.I.	Verde Lido	U.I. Calculado	Erro				
66	28	78,2	12,2	135	34	139,0	4,0				
66	29	87,1	21,1	135	33	127,6	7,4				
66	28	78,2	12,2	135	33	127,6	7,4				
66	29	87,1	21,1	135	34	139,0	4,0				
66	28	78,2	12,2	135	35	150,8	15,8				
66	29	87,1	21,1	135	33	127,6	7,4				