

## Limitações no uso da técnica de contraimunoeletroforese (CIE) para o diagnóstico das meningites causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b

### *Limitations in the use of counterimmunoelectrophoresis (CIE) for diagnosis of Haemophilus influenzae type b meningitis*

Lucila O. Fukasawa<sup>1</sup>, Maristela M. Salgado<sup>1</sup>, Maria Gisele Gonçalves<sup>1</sup>, Anna Vera Custódio<sup>1</sup>, Terezinha P. Araújo<sup>1</sup>, Telma R. M. P. Carvalhanas<sup>2</sup>, Ricardo K. M. Albernaz<sup>2</sup>, Joana D'Arc P. Reis<sup>3</sup>, Maria Irene Weyl A. Costa<sup>3</sup> e Claudio T. Sacchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Seção de Imunologia. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup>Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública. Ministério da Saúde. Brasília, DF, Brasil

---

#### RESUMO

A contraimunoeletroforese (CIE) é uma técnica amplamente utilizada no Brasil para o diagnóstico laboratorial indireto de meningites causadas por *Neisseria meningitidis* (Men) dos sorogrupos A, B e C e *Haemophilus influenzae* (Hi) tipo b, desde a década de 1970. A introdução da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) na rotina diagnóstica das meningites causadas por Men, Hi e *Streptococcus pneumoniae* (Spn), no Instituto Adolfo Lutz, levou à identificação de resultados discrepantes entre as duas metodologias. O objetivo deste trabalho foi investigar 46 amostras com resultados de CIE positivos para Hib. Deste total, 26 amostras (57%) tiveram resultados caracterizados como falsos positivos para Hib, pois nenhuma delas foi positiva para este agente por RT-PCR e teste de látex. Destas, 21 (46%) foram positivas para Spn por RT-PCR e látex e 5 (11%) foram negativas tanto para Hib ou Spn por ambas as técnicas. Estes dados evidenciaram a alta porcentagem de resultados falsos positivos para o componente Hib obtidos pela técnica de CIE. Nós recomendamos o uso do látex ou RT-PCR e não a CIE para a detecção de Hib ou, então, o uso de um segundo teste para confirmar casos de Hib positivos por CIE.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Haemophilus influenzae* b. Contraimunoeletroforese. Reação cruzada. *Streptococcus pneumoniae*. Meningite bacteriana.

## ABSTRACT

In Brazil, counterimmunoelectrophoresis (CIE) is a widely used laboratory method for bacterial meningitis diagnosis caused by *Neisseria meningitidis* (Men) serogroups A, B and C and *Haemophilus influenzae* (Hi) type b since 1970's. With the introduction of real-time PCR (RT-PCR) assay at Instituto Adolfo Lutz routine diagnosis of meningitis caused by Men, Hi and *Streptococcus pneumoniae* (Spn), discrepant results between these two methodologies were found. In this work we investigated 46 cases with CIE positive results for Hib. Our main goal was to determine the ratio of Hib false positive results by CIE. For comparisons, we used RT-PCR method, latex agglutination test and culture when available. Among the 46 CIE Hib positive samples, 26 (57%) were false positive: 21 (46%) samples were Spn positives and 5 (11%) samples were negatives for Spn and Hib by both latex and RT-PCR methods. Our results show a high percentage of false positive results by CIE regarding Hib detection in CSF and sera samples. We recommend using latex agglutination or RT-PCR rather than CIE for Hib determination or a second test confirmation for Hib CIE positive samples.

**KEY WORDS:** *Haemophilus influenzae* b. Counterimmunoelectrophoresis. Cross-reaction. *Streptococcus pneumoniae*. Bacterial meningitis.

## INTRODUÇÃO

Amplamente utilizada no Brasil, a contra-imunoeletroforese (CIE) é uma técnica para o diagnóstico laboratorial indireto de meningites causadas por *Neisseria meningitidis* (Men) dos sorogrupos A, B e C e *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). Esta técnica foi padronizada, nos anos 1970, para os sorogrupos A, B e C de Men pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) – órgão da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP) –, o qual é o Laboratório de Referência Nacional para Meningites Bacterianas, em função da ocorrência de duas grandes epidemias de doença meningocócica no

País.<sup>1</sup> Nos anos 1980, o componente Hib foi adicionado à técnica<sup>2</sup> e, desde então, esta metodologia tem sido empregada na rotina diagnóstica das meningites bacterianas em toda a rede de laboratórios do IAL (laboratórios Central e Regionais) e em 20 dos 27 Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen) do Brasil.

A CIE é uma técnica baseada na detecção de antígenos polissacarídicos que envolvem a cápsula da bactéria presente na amostra clínica por uso de antissoros hiperimunes produzidos em cavalos ou carneiros. Como esta técnica emprega antissoros policlonais, existe a possibilidade da ocorrência de

reatividade cruzada caso haja similaridade antigênica entre polissacarídeos capsulares de diferentes espécies bacterianas. Especificamente, é conhecido que o polissacarídeo capsular do Hib é imunoquimicamente similar ao de outras bactérias capsuladas, incluindo o *Streptococcus pneumoniae* (Spn) do sorotipo 6.<sup>3</sup>

Em junho de 2007, o IAL introduziu na rotina diagnóstica das meningites bacterianas um ensaio de PCR em tempo real (RT-PCR) para a detecção simultânea de Men, Hi e Spn,<sup>4</sup> juntamente com a implantação do Programa Sentinela de Vigilância Epidemiológica das Meningites Bacterianas pela CCD/SES-SP. Durante os anos de 2007 a 2009, amostras clínicas de líquido (LCR) e soro de pacientes provenientes das unidades sentinelas da Grande São Paulo foram analisados por ambas as técnicas, e resultados discrepantes foram observados.

O presente trabalho teve como objetivo investigar todas as 46 amostras positivas para Hib por CIE recebidas entre 2007 e 2009, e esclarecer as discrepâncias observadas. Os resultados da CIE foram comparados com os resultados da RT-PCR, aglutinação pelo látex e cultura bacteriana, quando disponível.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este foi um estudo de análise retrospectiva de dados secundários, cuja fonte foi a base de dados do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, relativos ao período de 4 de junho de 2007 a 30 de maio de 2009. Como utilizou dados secundários, não houve coleta de amostras de sangue ou outro material biológico. Os dados deste trabalho são provenientes de projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade

de São Paulo (FSP-USP), e aprovada pela Conep protocolo nº 1827, parecer 854/09. A descrição das técnicas e do processamento de amostras abaixo simplesmente descreve os procedimentos laboratoriais de rotina utilizados na época da realização dos respectivos exames.

**Contraímunoeletroforese (CIE)** – A CIE foi realizada em fita de acetato de celulose empregando-se antissoros policlonais contra Men A, B, C ou Hib produzidos em cavalos ou carneiros e corrida em tampão de Tris-Acetato 0,05 M, pH 8,6. Após a corrida (10 minutos a 200 V), as fitas foram lavadas com solução salina e coradas com solução de Ponceau S a 0,5% (p/v).<sup>5</sup>

**Extração de DNA** – A extração de DNA de LCR ou soro foi feita utilizando-se o kit comercial QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen), conforme orientação do fabricante, com exceção do volume de LCR empregado na extração, que passou a ser de 500µL.

**PCR em tempo real** – A reação de RT-PCR foi realizada em sistema TaqMan no equipamento da Applied Biosystems, modelo 7300. A RT-PCR foi empregada para a detecção de dois genes diferentes e específicos de Spn: (i) o gene *lytA*, que codifica para a proteína autolisina<sup>6</sup> e (ii) o gene *ply*, que codifica para a pneumolisina.<sup>7</sup> Também foram pesquisados dois genes diferentes e específicos para a detecção de Hib: (i) o gene *bexA*, que codifica para a proteína envolvida no transporte de material capsular,<sup>7</sup> e (ii) o gene *cap b*, específico para o sorotipo b de Hi. A genotipagem de Hi por RT-PCR foi realizada de acordo com protocolo descrito por MAAROUFI.<sup>8</sup>

**Teste de aglutinação do látex** – O teste de látex foi realizado empregando-se o kit Pastorex Meningitis (Bio-Rad), conforme orientação do fabricante.

## RESULTADOS

Foram analisadas 46 amostras (41 de LCR e 5 de soro) com resultados de CIE positivos para Hib (Tabela 1). Entre estas amostras, apenas 20 (43%) confirmaram a presença de DNA de Hib pela amplificação dos genes *bexA* e *cap b* através das reações de RT-PCR. Estas amostras também apresentaram resultados positivos para Hib pelo teste de aglutinação do látex (Tabela 1, Grupo I).

Vinte e uma amostras (46%) foram identificadas como Spn por RT-PCR pela amplificação de ambos os genes *lytA* e *ply*. Quando adicionalmente testadas pelo teste do látex, todas estas 21 amostras foram positivas para Spn e negativas para Hib

(Tabela 1, Grupo II). Adicionalmente, 5 das 21 amostras caracterizadas como Spn (nº 30.201, 48.559, 62.242, 84.538, 8.687) apresentaram resultado positivo para Spn por cultura, considerada o padrão-ouro, corroborando com os dados das reações de RT-PCR.

As cinco (11%) amostras restantes, positivas para Hib pela CIE, não foram caracterizadas como Hi tampouco como Spn por RT-PCR ou teste do látex (Tabela 1, Grupo III).

No total, 26 (57%) dos resultados de CIE para Hib não puderam ser confirmados por técnicas moleculares ou pelo teste de aglutinação do látex, sendo, portanto, considerados como falsos positivos (Figura 1).

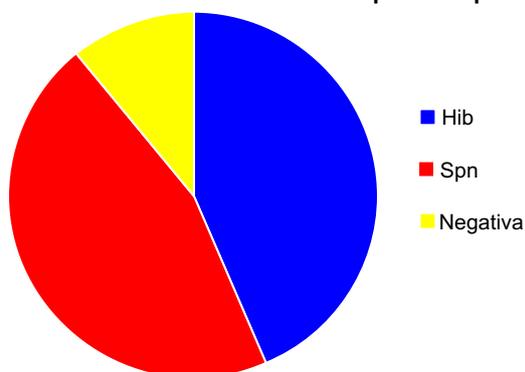
**Tabela 1.** RT-PCR para detecção de Hib (genes *bexA* e *cap b*) e Spn (genes *lytA* e *ply*) e teste de aglutinação do látex de amostras de LCR ou soro positivas para Hib pela técnica de CIE (n = 46). Grupo I: amostras Hib positivas por CIE, RT-PCR e teste de látex (n = 20); Grupo II: amostras Hib positivas por CIE, mas positivas para Spn por RT-PCR e teste de látex (n = 21); Grupo III: amostras Hib positivas por CIE, mas negativas por RT-PCR e teste de látex (n = 5).

Grupo	Nº	Tipo amostra	CIE	RT_PCR				Teste de látex
				Hi <i>bexA</i>	Hi <i>cap b</i>	Spn <i>lytA</i>	Spn <i>ply</i>	
I (n = 20)	100.081	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	17.342	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	20.513	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	20.860	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	30.945	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	34.922	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	34.939	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	40.858	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	43.674	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	46.528	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	4.728	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	60.896	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	63.274	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	68.109	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	75.639	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	76.922	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	82.527	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	83.290	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	85.687	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib
	88.383	LCR	Hib	+	+	-	-	Hib

Grupo	Nº	Tipo amostra	CIE	RT_PCR				Teste de látex
				Hi <i>bexA</i>	Hi <i>cap b</i>	Spn <i>lytA</i>	Spn <i>ply</i>	
II (n = 21)	30.201	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	34.128	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	42.512	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	48.559	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	48.740	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	51.870	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	55.043	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	57.528	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	5.921	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	62.242	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	69.660	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	72.001	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	74.352	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	75.640	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	80.571	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	84.538	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	8.687	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	9.236	LCR	Hib	-	-	+	+	Spn
	24.367	Soro	Hib	-	-	+	+	Spn
	30.202	Soro	Hib	-	-	+	+	Spn
	49.382	Soro	Hib	-	-	+	+	Spn

Grupo	Nº	Tipo amostra	CIE	RT_PCR				Teste de látex
				Hi <i>bexA</i>	Hi <i>cap b</i>	Spn <i>lytA</i>	Spn <i>ply</i>	
III (n = 5)	3-238	LCR	Hib	-	-	-	-	-
	42.630	LCR	Hib	-	-	-	-	-
	55.008	LCR	Hib	-	-	-	-	-
	43.674	Soro	Hib	-	-	-	-	-
	52.150	Soro	Hib	-	-	-	-	-

Resultados de RT-PCR e Látex em amostras Hib positivas por CIE



**Figura 1.** Representação esquemática das porcentagens de amostras positivas para Hib (43%), Spn (46%) ou negativas (11%) por reações de RT-PCR e aglutinação do látex entre amostras positivas para Hib por CIE (n = 46).

## DISCUSSÃO

A CIE é uma técnica simples e de fácil execução, podendo ser empregada para a detecção de antígenos bacterianos em diferentes tipos de materiais clínicos, tais como soro, urina e LCR. Desde a década de 1970 tem sido empregada como método indireto para o diagnóstico laboratorial de meningites causadas por Men A, B e C ou Hib em todos os laboratórios do IAL e em vários Lacen do País.

O exame de cultura não é realizado no IAL, mas nas próprias unidades de saúde. Rotineiramente as amostras de casos suspeitos de meningite bacteriana são encaminhadas ao IAL para a realização da CIE, sem quaisquer outros dados laboratoriais. Dessa forma, não foi possível a detecção de nenhum problema de especificidade da CIE entre as amostras analisadas durante vários anos. Apenas a partir de 2007, com a introdução da RT-PCR na rotina diagnóstica das meningites no IAL, foi possível detectar discrepâncias de resultados, o que nos levou a esta investigação.

Como os antissoros utilizados são policlonais, reatividade cruzada entre antissoro e diferentes espécies bacterianas que apresentam cápsulas polissacarídicas com composição química semelhantes podem ocorrer. BALLARD e colaboradores<sup>3</sup> descreveram três casos de pacientes com cultura positiva para Spn sorotipo 6 que apresentaram resultados positivos para Hib por CIE empregando-se antissoro contra Hib produzido em burro. Ambas as bactérias, Hib e Spn sorotipo 6, apresentam ribitol-fosfato na composição de sua cápsula polissacarídica, o que poderia explicar a reativi-

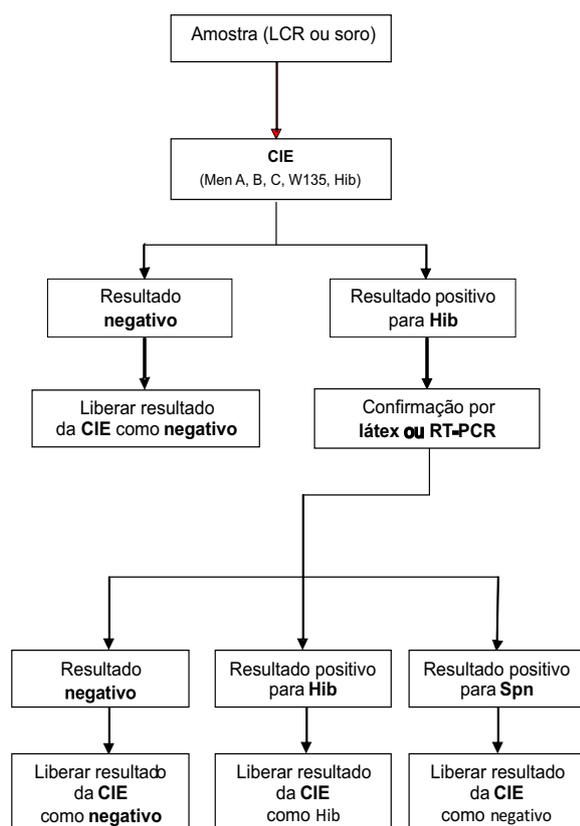
dade cruzada observada entre as duas bactérias.

Alguns trabalhos relataram a existência de reatividade cruzada entre o antissoro Hib e outras bactérias capsuladas com ribitol em sua composição química, tais como *Staphylococcus aureus*,<sup>12,13</sup> *Escherichia coli* K100 e O75,<sup>14</sup> *Streptococcus viridans*<sup>3</sup> e *Bacillus pumilus*.<sup>13,15</sup> Outros sorotipos de Spn, como o 15, 29 e 34, também apresentaram reação cruzada em ensaios de precipitação empregando o antissoro contra Hib.<sup>3,13</sup> Adicionalmente, um estudo relatou a existência de resultados falsos positivos para Hib por CIE em amostras de pacientes com culturas positivas para *Streptococcus* grupo B ou *S. aureus*.<sup>16</sup>

Todas as amostras positivas para Spn pelas reações de RT-PCR foram capazes de amplificar os dois genes característicos de Spn: *lytA* e *ply*. A probabilidade destes resultados serem falsos é extremamente baixa, uma vez que a RT-PCR apresenta alta especificidade (100% para o genes *lytA* e *ply*).<sup>6,7</sup> Adicionalmente, destas 21 amostras-5 possuem cultura positiva para Spn (resultados obtidos no hospital de origem da amostra). Diferentemente da CIE, o teste de aglutinação do látex apresentou resultados concordantes com a RT-PCR, ou seja, todas estas 21 amostras Hib positivas pela CIE foram positivas para Spn pelo teste de látex, concordando com os resultados da RT-PCR.

O IAL, em conjunto com a Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública/Ministério da Saúde (CGLAB/MS) e o Centro de Vigilância

Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” (CVE/CCD/SES-SP) sugere um algoritmo para a liberação de resultados da CIE, apresentado na Figura 2. Em resumo, todas as amostras positivas para Hib pela CIE e com cultura negativa ou não realizadas devem ser obrigatoriamente confirmadas por uma segunda técnica: RT-PCR ou teste de aglutinação do látex. Resultados de CIE positivos para Hib somente serão liberados como Hib após confirmação pela segunda técnica, pois o diagnóstico diferencial entre estas duas bactérias é essencial para a tomada de decisões pelas autoridades em saúde pública.



**Figura 2.** Algoritmo de liberação de resultados da CIE em caso de amostras positivas para Hib.

Em função dos resultados apresentados no presente trabalho, muito se discute em relação à confiabilidade do exame de CIE. Até o presente momento, somente verificamos problemas de reatividade cruzada em relação ao componente Hib, não sendo observados problemas com os antissoros contra Men A, B e C, mesmo após a introdução da RT-PCR. Entretanto, em casos específicos, reações cruzadas também podem ocorrer entre bactérias com composição capsular semelhante a dos meningococos. A reação cruzada mais conhecida ocorre entre Men B e *E. coli* K1, pois ambas as bactérias apresentam idêntica composição química de suas cápsulas polissacarídicas.<sup>17</sup> Neste caso, a distinção entre estas duas bactérias somente poderia ser realizada por cultura ou RT-PCR, uma vez que no teste de látex também ocorre esta reação cruzada.

Diante do cenário descrito, o IAL (Laboratório Central) retirou a CIE da rotina diagnóstica das meningites bacterianas a partir de 2010, substituindo-a pela de RT-PCR. Além de apresentar maior especificidade e sensibilidade que a CIE, a RT-PCR é capaz de detectar Men de todos os sorogrupos, Hi de 4 sorotipos (a, b, c, d) e todos os sorotipos de Spn, componente ausente na reação de CIE e que constitui o segundo agente mais frequentemente causador de meningite bacteriana no País.

### Agradecimentos

A todos os hospitais pertencentes ao Programa Sentinela das Meningites Bacterianas do município de São Paulo, pelo encaminhamento das amostras.

## REFERÊNCIAS

1. Palhares M, Gelli DM, Almeida MCR, Mellis CEA, Takeda AK, Taunay AE. Pesquisa de polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* do grupo C no líquido cefalorraquidiano por imunoeletroforese cruzada em acetato de celulose. Rev Inst Adolfo Lutz. 1973;33:85-9.
2. Takeda AK, Umekita LF, Boscardin NB, Meles CAE, Taunay AE. Imunoeletroforese cruzada no diagnóstico de meningite causada por *Haemophilus influenzae* tipo b. Rev Inst Adolfo Lutz. 1979;39:165-9.
3. Ballard TL, Spangler A, Roe MH, Glode MP. Clinically significant cross-reactions with counterimmunoelectrophoresis between pneumococcus type 6 and *Haemophilus influenzae* type b. J Clin Microbiol. 1985;22(5):754-6.
4. Instituto Adolfo Lutz, Seção de Imunologia, Laboratório de Meningites Bacterianas. Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz. Bepa. 2007;4(40):24-7.
5. Requejo HI, Nascimento CM, Fehrat CK. Comparison of counterimmunoelectrophoresis, latex agglutination and bacterial culture for the diagnosis of bacterial meningitis using urine, serum and cerebrospinal fluid samples. Braz J Med Biol Res. 1992;25(4):357-67.
6. Carvalho MGS, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR detection assay to *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. J Clin Microbiol. 2007;45(8):2460-6.
7. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol. 2001;39(4):1553-8.
8. Maaroufi Y, De Bruyne JM, Heymans C, Crokaert F. Real-time PCR for determining capsular serotypes of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 2007;45(7):2305-8.
9. Coonrod JD, Rytel MW. Determination of aetiology of bacterial meningitis by counter-immunoelectrophoresis. Lancet. 1972;1(7761):1154-7.
10. Hoffman TA, Edwards EA. Group-specific polysaccharide antigen and humoral antibody response in disease due to *Neisseria meningitidis*. J Infect Dis. 1972;126(6):636-44.
11. Edwards EA. Immunological investigations of meningococcal disease. I. Group-specific *Neisseria meningitidis* antigen presented in the serum of patients with fulminant meningococemia. J Immunol. 1971;106(2):314-7.
12. Finch CA, Wilkinson HW. Practical considerations in using counterimmunoelectrophoresis to identify the principal causative agents of bacterial meningitis. J Clin Microbiol. 1979;10(4):519-24.
13. Argaman M, Liu TY, Robbins JB. Polyribitol-phosphate: an antigen of four gram-positive bacteria cross-reactive with capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. J Immunol. 1974;112:649-55.

14. Schneerson R, Robbins JB. Induction of serum *Haemophilus influenzae* type b capsular antibodies in adult volunteers fed cross-reacting *Escherichia coli* O75:K100:H5. *New Engl J Med.* 1975;292:1093-6.
15. Myerowitz RL, Gordon RE, Robbins JB. Polysaccharides of genus *Bacillus* cross-reactive with the capsular polysaccharides of *Diplococcus pneumoniae* type III, *Haemophilus influenzae* type b, and *Neisseria meningitidis* group A. *Infect Immun.* 1973;8(6):896-900.
16. Naiman HL, Albritton WL. Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of acute infection. *J Infect Dis.* 1980;142(4):524-31.
17. Kasper DL, Winkelhake JL, Zollinger WD, Brnadt BL, Artenstein MS. Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O7:K1(L):NM and group B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol.* 1973;110:262-8.

Recebido em: 29/04/2009  
Aprovado em: 30/03/2010

**Correspondência/Correspondence to:**

Lucila O. Fukasawa  
Av. Dr. Arnaldo, 355 - 11º andar  
CEP: 01246-902 - São Paulo/SP - Brasil  
Tel.: 55 11 3068-2899  
E-mail: lucilaof@gmail.com