

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Rainara Moreno Sanches de Almeida

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DETECÇÃO MÚLTIPLA E SIMULTÂNEA DE
ANTICORPOS DA CLASSE IGM CONTRA *Toxoplasma gondii*, RUBÉOLA E
CITOMEGALOVÍRUS.**

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS,
2022

RAINARA MORENO SANCHES DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DETECÇÃO MÚLTIPLA E SIMULTÂNEA DE
ANTICORPOS DA CLASSE IGM CONTRA *Toxoplasma gondii*, RUBÉOLA E
CITOMEGALOVÍRUS.**

Dissertação do Programa de Mestrado em
Engenharia Biomédica

Aluna: Rainara Moreno Sanches de Almeida
Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares -
UNIVAP
Coorientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
2022

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Almeida, Rainara Moreno Sanches
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DETECÇÃO MÚLTIPLA E SIMULTÂNEA
DE ANTICORPOS DA CLASSE IGM CONTRA *Toxoplasma gondii*, RUBÉOLA E
CITOMEGALOVÍRUS / Rainara Moreno Sanches Almeida; orientador,
Dra. Cristina Pacheco Soares; co-orientador Dr. Newton Soares da
Silva . - São José dos Campos, SP, 2022.
60 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Triagem neonatal. 3. Multiplex.
4. Microesferas magnéticas. 5. Validação analítica. I. Pacheco
Soares, Dra. Cristina , orient. II. Soares da Silva , Dr. Newton,
co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Rainara Moreno Sanches Almeida, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 17 de Janeiro de 2023.



RAINARA MORENO SANCHES DE ALMEIDA

“DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DETECÇÃO MÚLTIPLA E SIMULTÂNEA DE ANTICORPOS DA CLASSE IGM CONTRA *Toxoplasma gondii*, RUBÉOLA E CITOMEGALOVÍRUS HUMANO.”

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

Prof.ª Dr.ª Juliana Ferreira Strixino	<i>Juliana Ferreira Strixino</i>
Prof.ª Dr.ª Cristina Pacheco Soares	<i>Cristina Pacheco Soares</i>
Prof. Dr. Newton Soares da Silva	<i>Newton Soares da Silva</i>
Prof. Dr. Leandro José Raniero	<i>Leandro José Raniero</i>
Prof. Dr. Guilherme Maerschner Ogawa	<i>Guilherme Maerschner Ogawa</i>

Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 14 de dezembro 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo suporte, amor e carinho ao longo de todos os anos da minha vida.

Ao meu marido pelo apoio e incentivo constante nessa etapa.

Aos meus orientadores pela confiança e amizade.

A empresa Intercientífica pelo suporte fundamental para o desenvolvimento do projeto.

E a todos que participaram e contribuíram desse trabalho.

RESUMO

O diagnóstico sorológico durante a triagem pré e neonatal é de extrema importância na prevenção de doenças. Dentre as doenças infecciosas, as mais comuns são a toxoplasmose, rubéola e citomegalovírus. Os métodos tradicionais de diagnóstico utilizados na triagem neonatal detectam por ensaio um único agente infeccioso. A utilização de métodos de detecção múltipla e simultânea aumenta a produtividade e diminui a quantidade de material utilizado, resultando em um ensaio mais eficiente do ponto de vista técnico, ambiental e econômico. O objetivo do nosso estudo é desenvolver um método de detecção simultânea de anticorpos da classe IgM contra *Toxoplasma gondii*, rubéola e citomegalovírus. Para isso foram realizados acoplamentos de diferentes antígenos em microesferas magnéticas, seguido de ensaios de desempenho para identificar os melhores parâmetros a serem utilizados, como melhor concentração e tampão. Após definido os acoplamentos, foram realizados ensaios para obtenção dos valores de corte, sensibilidade e especificidade de cada antígeno acoplado. Em seguida, foram realizados ensaios de desempenho para validação analítica dos produtos diagnósticos seguindo as normas na Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA). Os parâmetros avaliados foram repetibilidade, reprodutibilidade, linearidade, robustez, alta dose, limite mínimo de detecção, especificidade analítica e estabilidade acelerada. Todos os dados obtidos atenderam aos critérios de aceitação da RDC 166/17 para utilização do produto diagnóstico em território nacional. Os ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade apresentaram Constante de Variação (CV) menor que 15% entre as replicatas do mesmo operador e operadores distintos. O kit apresentou linearidade em toda a faixa de trabalho com R² acima de 0.990 e não foi observado efeito de alta dose de anticorpos na diluição de trabalho escolhida. Além disso, o kit não apresentou interferência da matriz com os resultados e foi observado que pequenas e deliberadas alterações no tempo de incubação de cada reagente não afetam de forma significativa nos dados obtidos.

Palavras-chave: triagem neonatal; multiplex; microesferas magnéticas; validação analítica.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR MULTIPLE AND SIMULTANEOUS DETECTION OF IGM CLASS ANTIBODIES AGAINST *Toxoplasma gondii*, RUBELLA AND CYTOMEGALOVIRUS.

ABSTRACT

Serological diagnosis during neonatal screening is extremely important in disease prevention. Among the infectious diseases, the most common are toxoplasmosis, rubella, and cytomegalovirus. Traditional diagnostic methods used in neonatal screening detect a single infectious agent per test. The use of multiple and simultaneous detection methods increases productivity and reduces the amount of material used, resulting in a more efficient test from a technical, environmental, and economic point of view. The aim of our study is to develop a method for the simultaneous detection of antibodies of the IgM class against *Toxoplasma gondii*, rubella and cytomegalovirus. For this purpose, couplings of different antigens to magnetic microspheres were carried out, followed by performance tests to identify the best parameters to be used, such as the best concentration and buffer. After defining the couplings, tests were performed to obtain the cutoff values, sensitivity, and specificity of each coupled antigen. Then, performance tests were carried out for the analytical validation of the diagnostic products, following the norms of the National Health Surveillance Agency (ANVISA). The evaluated parameters were repeatability, reproducibility, linearity, robustness, high dose, minimum detection limit, analytical specificity, and accelerated stability. All data obtained met the acceptance criteria of RDC 166/17 for the use of the diagnostic product in the national territory. The repeatability and reproducibility tests showed a Constant Variation (CV) of less than 15% between replicates of the same operator and different operators. The kit showed linearity throughout the working range with R^2 above 0.990 and no effect of high antibody dose was observed in the chosen working dilution. In addition, the kit did not show interference from the matrix with the results, and it was observed that small and deliberate changes in the incubation time of each reagent do not significantly affect the data obtained.

Keywords: neonatal screening; multiplex; magnetic microspheres; analytical validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Vias de transmissão do <i>Toxoplasma gondii</i>	15
Figura 2: Formatos de ensaios com microesferas acopladas a antígenos e anticorpos específicos..	22
Figura 3: Tecnologia de leitura do equipamento Magpix.	27
Figura 4 : Valores de MFI do antígeno TG com diferentes concentrações e utilizando PBS e MES como tampão de acoplamento.	33
Figura 5: Valores de MFI do antígeno TM4 com diferentes concentrações utilizando PBS e MES como tampão de acoplamento.	34
Figura 6: Valores de MFI do antígeno TM3 e TM5 a 120 µg/mL utilizando PBS como tampão de acoplamento.....	35
Figura 7: Valores de MFI do antígeno RUB-1 acoplado na concentração de 120 µg/mL com PBS e MES como tampão de acoplamento.	35
Figura 8: Valores de MFI do antígeno RUB-1 acoplados nas concentrações de 120 e 90 µg/mL com PBS como tampão de acoplamento.....	36
Figura 9: Valores de MFI do RUB-2 e RUB-3 acoplados na concentração de 120 µg/mL com PBS como tampão de acoplamento.	37
Figura 10: Reatividade do antígeno RUB-4 acoplado na concentração de 120 µg/mL com PBS e MES como tampão de acoplamento.	38
Figura 11: Reatividade do antígeno RUB-4 acoplado na concentração de 30 µg/mL com PBS como tampão de acoplamento em diluição seriada de 8 quedas iniciando em 1/200.	38
Figura 12: Reatividade do antígeno CM-1 acoplado na concentração de 75 µg/mL com PBS como tampão de acoplamento em diluição seriada de 8 quedas.	39
Figura 13: Reatividade dos antígenos de CMV acoplados na concentração de 120 µg/mL utilizando PBS como tampão de acoplamento.....	40
Figura 14: Comparação da reatividade dos antígenos CM-2, CM-4, CM-6 e CM-8 de CMV acoplados na concentração de 120 µg/ml com PBS e MES como tampão de acoplamento.	41
Figura 15: Análise ROC dos antígenos com melhor desempenho de Toxo, Rub e CMV que serão utilizados na plataforma multiplex.	42
Figura 16: Curva de reatividade das amostras em relação ao fator de diluição nos parâmetros de TOXO, RUB e CMV.	48
Figura 17: Gráficos da estabilidade acelerada dos três lotes piloto do kit TOXO/RUB/CMV IgM.	52
Figura 18: Estabilidade a longo prazo do parâmetro de TOXO..	53

Figura 19: Estabilidade a longo prazo do parâmetro de RUB.....	54
Figura 20: Estabilidade a longo prazo do parâmetro de CMV	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados ROC para os antígenos de TG, RUB-4 e CM-6.....	42
Tabela 2: Dados de exatidão dos parâmetros de TOXO, RUB e CMV na plataforma multiplex.	43
Tabela 3- Resultados do operador 1 com mediana, desvio padrão e desvio padrão relativo de nove amostras analisadas com o kit TOXO/RUB/CMV IgM.	44
Tabela 4: Resultados dos laboratórios 1 e 2 com mediana, desvio padrão e desvio padrão relativo de nove amostras analisadas com kit TOXO/RUB/CMV IgM.....	45
Tabela 5: Limite de detecção em MFI do kit TOXO/RUB/CMV IgM.....	46
Tabela 6- Reatividade da amostra contendo componentes do sangue após separação de plasma.....	47
Tabela 7: Reatividade de amostras em diluições e 1/10 a 1/1280 para demonstrar efeito de alta dose nos parâmetros de Toxo, Rub e CMV.	47
Tabela 8: Reatividade em incubação de amostras a 80, 90 e 100 min.	49
Tabela 9: Reatividade de amostras em incubação de anticorpo secundário a 20, 30 e 40 min.....	50
Tabela 10: Reatividade de amostras em incubação de Ficoeritrina a 20, 30 e 40 min..	50

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva
BSA	Albumina
CMV	Citomegalovírus
CV	Constante de Variação
<i>Cut-off</i>	Valor de corte
DESP	Desvio Padrão
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FP	Falso positivo
FN	Falso negativo
IU	Intervalo de Confiança
MÊS	Ácido 2-etanossulfônico
MFI	Intensidade Média de Fluorescência
NaH ₂ PO ₄	Tampão de Ativação
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBS-TBN	Tampão de diluição
PKU	Fenilcetonúria
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RUB	Rubéola
SUS	Sistema Único de Saúde
TOXO	Toxoplasmose
VPN	Valor preditivo positivo
VPP	Valor preditivo negativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO GERAL	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Toxoplasmose	15
2.2 Rubéola	17
2.3 Citomegalovírus	18
2.4 Triagem Pré e Neonatal	19
2.5 Plataforma Multiplex	21
3 JUSTIFICATIVA	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Escolha e acoplamento dos antígenos	25
4.2 Desempenho dos antígenos acoplados na metodologia multiplex	26
4.3 Validação do kit em desenvolvimento	27
4.4 Amostras biológicas	31
4.5 Análise dos resultados	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Escolha e acoplamento dos antígenos	33
5.2 Análise ROC – Multiplex	41
5.3 Exatidão	43
5.4 Repetibilidade	44
5.5 Reprodutibilidade	45
5.6 Sensibilidade Analítica (LMD)	46
5.7 Especificidade Analítica	47
5.8 Alta dose	47
5.9 Linearidade	48
5.10 Robustez	49
5.11 Estabilidade Acelerada	51
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A detecção de anticorpos contra doenças infecciosas, é uma atividade amplamente utilizada em diversas situações. Dentre as técnicas de detecção laboratoriais disponíveis, o método amplamente utilizado é o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) que detecta por ensaio um único agente infeccioso a partir da ligação antígeno-anticorpo (GAN; PATEL, 2013).

Apesar de comumente utilizado, os métodos tradicionais de diagnóstico sorológico, como ELISA, apresentam como desvantagem a necessidade de maiores quantidades de amostras e tempo para análise, uma vez que cada analito de interesse necessita de um ensaio específico.

Novas tecnologias foram desenvolvidas visando a otimização dos métodos diagnósticos, entre elas destaca-se a tecnologia xMAP® da empresa Luminex Corporation que permite a análise simultânea de diversos parâmetros em uma mesma amostra biológica com o uso de microesferas (STEPHEN, 2017).

Visando atender a necessidade de desenvolvimento de métodos diagnósticos eficazes para a triagem pré e neonatal no país, está em fase de desenvolvimento um kit multiplex para doenças infecciosas utilizando a tecnologia xMAP® de microesferas magnéticas. O kit em desenvolvimento possui a finalidade de detectar de forma simultânea anticorpos IgM anti-toxoplasmose, anti-rubéola e anti-citomegalovírus em amostras de sangue em papel filtro.

A triagem pré e neonatal é um método necessário para evitar que graves infecções acometam o feto e o neonato. Diversos agentes infecciosos possuem a capacidade de transmissão vertical da mãe para o feto por via transplacentária ou por contato direto durante o parto. As infecções mais comuns são representadas pela sigla TORCH, que inclui toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus entre outras (CHEN *et al.*, 2019; GARCÍA-BERMEJO; DE ORY-MANCHÓN, 2015).

O desenvolvimento de novo kit de diagnóstico com uso de microesferas demanda estudos sobre o desempenho que um kit de diagnóstico *in vitro* deve apresentar para ser

utilizado no Brasil. Estes parâmetros de desempenho foram criados e são avaliados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Para a validação e registro do kit de diagnóstico *in vitro* e sua entrada no mercado nacional são necessários diferentes estudos seguindo as normas da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 36 de 26 de agosto de 2015 da ANVISA (BRASIL, 2015).

O objetivo do presente estudo é o desenvolvimento de método de detecção múltipla e simultânea de anticorpos humanos da classe IgM contra *Toxoplasma gondii*, rubéola e citomegalovírus humano realizando todos os ensaios necessários para produzir dados de desempenho seguindo as normas da ANVISA.

1.1 OBJETIVO GERAL

Esse projeto visa o desenvolvimento de um método para detecção múltipla e simultânea de anticorpos IgM contra *Toxoplasma gondii*, rubéola e citomegalovírus utilizando a tecnologia xMAP® da empresa Luminex Corporation.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar o acoplamento de diferentes antígenos às microesferas magnéticas a fim de identificar os melhores parâmetros a serem utilizados.
- Verificar o desempenho dos antígenos acoplados na metodologia multiplex baseado nas microesferas magnéticas e utilizando amostras adquiridas de empresas comerciais.
- Obter valores de sensibilidade, especificidade, acurácia e valores de corte (*cut-off*).
- Realizar ensaios de desempenho para validação do produto na ANVISA, sendo eles repetibilidade, reprodutibilidade, linearidade, robustez, alta dose, limite mínimo de detecção e estabilidade.

- Verificar a estabilidade acelerada e a longo prazo da metodologia em desenvolvimento sobre diferentes condições de armazenamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Toxoplasmose

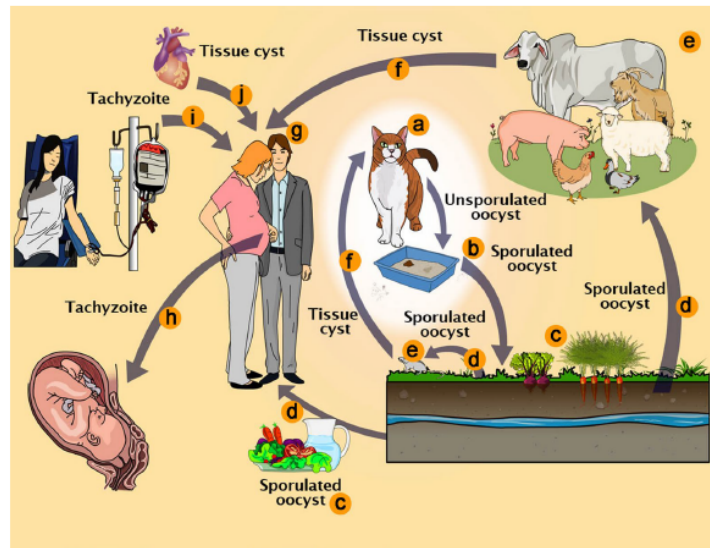
A toxoplasmose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* presente em aproximadamente dois bilhões de pessoas ao redor do mundo. A sua alta prevalência e o grande número de manifestações possíveis torna a toxoplasmose uma das doenças zoonóticas mais prejudiciais (SMITH *et al.*, 2021).

O ciclo de vida do organismo possui duas formas, sendo elas a sexuada e a assexuada. Na fase assexuada o parasita possui a capacidade de infectar qualquer célula nucleada em todos os animais de sangue periférico, obtendo um grande número de hospedeiros intermediários. Essa fase é considerada a forma proliferativa de rápida divisão caracterizada pela presença dos taquizoítos (SAADATNIA; GOLKAR, 2012).

Na fase sexuada apenas os felinos podem servir como hospedeiros definitivos devido a deficiência única na atividade da delta-6-desaturase intestinal em gatos. Nessa fase o parasito se encontra na forma de oocistos com capacidade de contaminar os recursos hídricos e os solos. A ingestão dos oocistos e a infecção congênita por taquizoítos são as principais formas de adquirir a toxoplasmose em humanos (ATTIAS *et al.*, 2020).

A infecção congênita ocorre de forma predominante após a infecção primária da mulher grávida e sua incidência varia com o trimestre da gravidez. Para mulheres não tratadas a incidência pode chegar a 65% no terceiro trimestre e a transmissão vertical ocorre principalmente com a parasitemia materna na fase aguda da doença. Nessa fase, os taquizoítos infectam e se multiplicam na placenta, chegando a circulação fetal. Na figura 1 é possível observar as vias de transmissão do parasita, incluindo a transmissão vertical da mãe contaminada para o feto (MCAULEY, 2014).

Figura 1: Vias de transmissão do *Toxoplasma gondii*.



Fonte: Attias *et al.*, 2020.

Legenda: a) hospedeiro definitivo, b) oocistos em fezes de gato, c) alimentos contaminados com oocistos, d) oocistos podem ser ingeridos por hospedeiros intermediários, e) hospedeiros intermediários (ex. bovinos, ovinos, aves e suínos), f) ingestão de cistos teciduais em carne crua, g) humano (hospedeiro intermediário), h) taquizoítos transmitidos por via transplacentária, i) e j) transmissão taquizoítos por transfusão de sangue e transplante de órgãos.

A toxoplasmose destaca-se, na maioria dos casos, pela ausência de sintomas. Devido a isso, é perigosa em gestantes e pacientes imunocomprometidos. A toxoplasmose primária em gestantes é um fator de risco devido a capacidade do parasito atravessar a placenta. A infecção congênita pode resultar em diversos danos potenciais ao feto, como hidrocefália, microcefália, retinocoroidite ou até mesmo a morte (KIEFFER; WALLON, 2013; SAADATNIA; GOLKAR, 2012).

A severidade dos sintomas irá depender de diversos fatores, como idade gestacional durante a infecção e o diagnóstico precoce. As formas mais utilizadas de diagnóstico consistem na detecção direta do parasita pelos métodos de coloração ou análise de DNA, ou indireta pela presença de anticorpos específicos (ATTIAS *et al.*, 2020).

A incidência da toxoplasmose em gestantes apresenta grandes variações ao redor do mundo. Em diversas regiões a notificação do diagnóstico às autoridades de saúde

pública não são obrigatórias e a inclusão da toxoplasmose nos programas de triagem pré e neonatal ainda não foram implementados (EL BISSATI *et al.*, 2018).

No Brasil a detecção de toxoplasmose vem sendo implementada nos programas de triagem pré e neonatal após aprovação da legislação nacional de 2020. Os métodos diagnósticos mais utilizados são baseados na detecção de anticorpos da classe IgG e IgM contra o parasito (PETERSEN *et al.*, 2022).

O diagnóstico sorológico é um método sensível, específico e possível de ser realizado em laboratórios de menor complexidade, sendo necessário cada vez mais o desenvolvimento de novas tecnologias na área que permitam otimizar a detecção de anticorpos nas diferentes fases da resposta imune.

2.2 Rubéola

A rubéola é uma infecção viral sistêmica causada pelo vírus do gênero *Rubivirus*. Em sua composição possui um genoma de RNA de fita simples cercado por um envelope lipídico complexo. O vírus se multiplica no revestimento do trato respiratório ou nos linfonodos e possui alta contagiosidade podendo se espalhar por contato direto ou pelo ar (DUSZAK, 2009).

Na maioria dos casos apresenta-se como uma doença leve caracterizada por sintomas como febre, erupção cutânea e linfadenopatia. Porém em gestantes se torna relativamente grave quando a infecção ocorre no início da gravidez (MAWSON; CROFT, 2019).

A rubéola congênita é uma desordem rara com consequências sistêmicas ao feto e recém-nascido. Infecções que acometem a gestante nos primeiros meses possuem elevados índices de defeitos congênitos e padrões de restrição ao crescimento. Além disso, nos casos mais graves são responsáveis por aborto espontâneo e natimorto (MAWSON; CROFT, 2019; TAMIRAT; HUSSEN; SHIMELIS, 2017).

As formas de tratamento atuais não são específicas, porém a rubéola pode ser prevenida pela imunização. A vacina contra o vírus tem como principal objetivo a

prevenção da síndrome da rubéola congênita e pode ser aplicada aos 12-15 meses de idade em combinação com sarampo ou caxumba (KAUSHIK; VERMA; KUMAR, 2018).

As principais vacinas licenciadas atualmente são baseadas no vírus atenuado e todas as mulheres grávidas devem ser testadas para anticorpos da classe IgG contra o vírus. Em casos negativos a vacina deve ser aplicada no pós-parto (KAUSHIK; VERMA; KUMAR, 2018).

Em todos os casos a triagem pré-natal e neonatal é de extrema importância para o diagnóstico precoce. O manejo diagnóstico a ser utilizado depende da idade gestacional no início da infecção. Em casos antes de 18 semanas é recomendado o RT-PCR para avaliação do RNA viral no líquido amniótico. Já para infecções após as 18 semanas a sorologia é recomendada (SILASI *et al.*, 2015).

2.3 Citomegalovírus

O citomegalovírus humano (CMV) é um dos vírus responsáveis pelo maior índice de infectividade e defeitos congênitos. O vírus pertence a subfamília Betaherpesvírus e é composto por uma dupla fita de DNA. Sua expressão genômica produz três categorias de proteínas virais caracterizadas como imediata, precoce e tardia (LANDOLFO *et al.*, 2003).

O vírus é conhecido mundialmente por causar uma ampla gama de síndromes clínicas que vão desde infecções assintomáticas até doenças fatais em indivíduos com sistema imune comprometido ou recém nascidos. O índice de prevalência do CMV varia de acordo com a idade, localização geográfica e situação socioeconômica, podendo corresponder a 100% em indivíduos idosos de países em desenvolvimento (LEUNG *et al.*, 2003).

A transmissão viral ocorre principalmente durante os primeiros estágios de vida por exposição a secreções humanas como saliva, sangue e urina. O vírus também pode ser transmitido por transfusões de sangue, transplante de órgãos ou via transplacentária (LEUNG *et al.*, 2003; NJUE *et al.*, 2021).

A infecção por CMV durante a gravidez pode levar a infecção fetal intrauterina ou a doença congênita. Aproximadamente 40% dos casos correspondem a gestantes com infecções primárias durante os primeiros meses de gravidez, embora a transmissão possa ocorrer em qualquer fase (DIOVERTI; RAZONABLE, 2016).

O CMV é a infecção viral congênita mais comum em humanos e a principal causa de perda auditiva não genética em crianças, além da elevada morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos. Devido ao seu alto nível de infectividade e síndromes possíveis, diversas formas de diagnóstico foram desenvolvidas para identificação rápida do vírus (ROSS; NOVAK; BOPPANA, 2011).

Uma variedade de métodos diagnósticos estão disponíveis atualmente, sendo no geral classificados como moleculares e não moleculares. Dentre os moleculares podemos citar isolamento viral a partir dos fluidos corporais e não moleculares a detecção de anticorpos específicos das classes IgG e IgM contra o vírus (CHIOPRIS *et al.*, 2020; DIOVERTI; RAZONABLE, 2016).

Embora diversas formas de diagnóstico sejam utilizadas atualmente, a triagem pré-natal de gestantes ainda não apresenta um consenso mundial a ser implementado. Em diversos países, mulheres grávidas não possuem conhecimento adequado sobre o vírus e as possíveis sequelas ao recém nascido infectado (CHIOPRIS *et al.*, 2020).

Milhares de crianças nascidas a cada ano sofrem de incapacidades e sequelas devido ao CMV e a triagem sorológica é uma importante ferramenta para prevenção e identificação precoce das mesmas.

2.4 Triagem Pré e Neonatal

A triagem pré-natal da mãe e do neonatal recém nascido são de extrema importância para a prevenção de diversas doenças. A triagem é realizada a partir da coleta de sangue seco em papel filtro que permite a detecção precoce de distúrbios graves e tratáveis, de modo a facilitar intervenções ou melhorar resultados adversos ao recém nascido acometido (WILCKEN; WILEY, 2008).

A triagem neonatal se iniciou a partir de 1963 com a fenilcetonúria (PKU) e agora diversos países ao redor do mundo possuem programas de testagem de recém nascidos. O programa possibilita que condições não evidentes em exames físicos sejam tratadas precocemente a fim de evitar graves sequelas ou até mesmo a morte (BERRY, 2015).

A triagem é um sistema que se inicia com a amostragem e finaliza com o acompanhamento de longo prazo da criança. Para isso, é necessário uma equipe multidisciplinar que envolve os pais, hospital, laboratório e especialistas do departamento de saúde. Portanto, a triagem não é um evento isolado e sim um processo de responsabilidade da saúde pública (BERRY, 2015).

Muitos países em desenvolvimento ainda não possuem um programa de triagem neonatal, porém os dados de incidência que demonstram a diminuição das taxas de mortalidade infantil podem ser utilizados para incentivar a implementação de programas nacionais (THERRELL JUNIOR; PADILLA, 2018).

Dentre os exames a serem realizados durante a triagem pré e neonatal a detecção de anticorpos contra doenças infecciosas é de extrema importância para saúde do feto e recém nascido. Isso porque diversas doenças infecciosas como Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovírus possuem alta taxa de incidência congênita devido a transmissão materno-fetal (CAMARGO NETO *et al.*, 2004).

Para a realização da triagem sorológica diversas técnicas laboratoriais estão disponíveis atualmente, em destaque o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). O método de ELISA é utilizado para detectar e quantificar uma substância alvo em uma amostra (SHAH; MAGHSOUDLOU, 2016).

Existem diversas categorias de ELISA, sendo elas direto, indireto, competição e sanduiche. O que define cada uma delas é a maneira como o antígeno é imobilizado e detectado. Em todas as formas, antígenos ou anticorpos específicos contra o alvo são imobilizados no fundo do poço da microplaca de ensaio (KONSTANTINO, 2017; SAHA; MARSDEN, 2009).

Apesar de comumente utilizado o ELISA permite a detecção de um único analito alvo por vez, o que resulta em um maior tempo de ensaio, número de amostras e insumos

necessários para a detecção das doenças infecciosas presentes no escopo do Programa da Triagem Neonatal. Visando a otimização dos métodos de ensaios, novas tecnologias vem sendo estudas e utilizadas, entre elas destaca-se a plataforma multiplex.

2.5 Plataforma Multiplex

Desde a introdução da triagem neonatal diversos avanços tecnológicos vem sendo utilizados para detecção precoce de condições congênitas. A implementação de novas metodologias permite o aumento significativo no número de doenças triadas com capacidade de incluir até cinquenta distúrbios (SAHAI; MARSDEN, 2009).

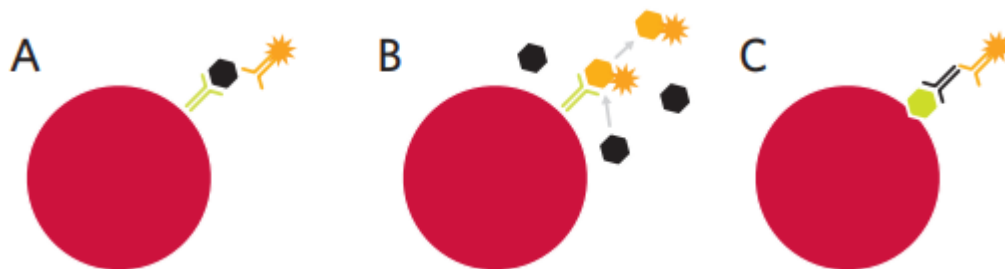
Com os recentes avanços da tecnologia, as plataformas com capacidade de multiplexar vários ensaios moleculares e imunológicos para a triagem de alto rendimento foram desenvolvidos. Trata-se de uma moderna plataforma que tem como principais vantagens a economia de tempo e reagentes (SAHAI; MARSDEN, 2009).

Dentre as novas tecnologias, a plataforma multiplex de microesferas magnéticas da empresa Luminex Corporation® permite o desenvolvimento de métodos de ensaios com até 100 analitos diferentes no mesmo poço da placa de ensaio (KHALIFIAN; RAIMONDI; BRANDACHER, 2015).

As microesferas magnéticas da Luminex consistem em micropartículas de poliestireno carboxiladas compostas por conjuntos espectrais distintos e, devido a isso, permitem o desenvolvimento de ensaios com diversos analitos diferentes no mesmo poço. Esta tecnologia possui a capacidade de quantificar e identificar múltiplos alvos em uma única amostra biológica com uma ampla faixa de detecção (DUNBAR, 2006).

Para que a detecção dos alvos seja realizada, analitos devem ser acoplados a estas microesferas. Este acoplamento é realizado por interação química entre os grupos carboxilas nas superfícies das microesferas com as amins primárias das proteínas. Estas ligações são covalentes e realizadas na maioria das vezes, com anticorpos ou antígenos específicos (DUNBAR, 2006; MAZHARI *et al.*, 2020). A figura 2 abaixo demonstra os formatos mais comuns de ensaios realizados.

Figura 2: Formatos de ensaios com microesferas acopladas a antígenos e anticorpos específicos.



Fonte: Luminex Corporation.

Legenda: A) ensaio sanduíche, B) ensaio competitivo e C) ensaio indireto.

O processo de acoplamento é composto por duas etapas principais, sendo elas a ativação das microesferas e a formação de um intermediário reativo capaz de ser substituído pela molécula específica para detecção do alvo. De maneira geral estas microesferas são utilizadas em pesquisa científica, e não existem muitas informações das mesmas no campo da triagem pré e neonatal.

3 JUSTIFICATIVA

No Brasil o programa de triagem neonatal se iniciou em 1976 por meio de iniciativas isoladas com apenas 55% de cobertura no território nacional. Além disso, os orçamentos públicos disponíveis cobriam apenas exames de diagnóstico, com ausência de assistência e acompanhamento dos acometidos (DE CARVALHO *et al.*, 2007).

Foi apenas em 2001 com a criação do Conselho Nacional que a triagem pré e neonatal no país obteve uma nova perspectiva no sistema público de saúde, com a criação de unidades de gestão e atendimento a gestantes e recém nascidos para cada estado brasileiro. Hoje os serviços de referência contam com mais de 170 profissionais de saúde de diversas áreas para acompanhamento dos acometidos após a triagem (DE CARVALHO *et al.*, 2007; SAHAI; MARSDEN., 2009).

A triagem tem o potencial de prevenir graves problemas de saúde, incluindo a morte. No mundo os programas de triagem neonatal evoluíram de um simples teste para um sistema abrangente e complexo capaz de detectar mais de 50 condições diferentes em diversos países (THERRELL *et al.*, 2015).

O programa de triagem não é utilizado apenas com o objetivo de rastrear doenças, mas, principalmente, buscar o tratamento e fornecer para a família recursos para que os acometidos se tornem saudáveis. Embora a prevenção resulte em uma diminuição dos recursos públicos, o lado social e humanitário não pode ser medido por padrões econômicos.

No Brasil, cada vez mais doenças vêm sendo implementadas nos programas de triagem oferecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), inclusive a adição de doenças infecciosas como Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovírus, as quais correspondem a um elevado número de infecções congênitas graves.

Com a ampliação das doenças triadas o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam a otimização e implementação das análises em todas as regiões, inclusive nas mais remotas do país é de extrema necessidade.

O desenvolvimento de novos produtos no formato multiplex, como o proposto neste estudo, permite a triagem rápida de diversas doenças dentro de uma população e facilita o monitoramento e gerenciamento contínuo da doença através de intervenções e acompanhamentos eficazes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Em linhas gerais o projeto foi dividido em três etapas principais, sendo elas: escolha e acoplamento dos antígenos às microesferas magnéticas, análise do desempenho dos antígenos acoplados na metodologia multiplex e validação do kit desenvolvido.

Todas as etapas estão descritas a seguir:

4.1 Escolha e acoplamento dos antígenos

Foram utilizados diferentes antígenos encontrados na literatura a partir de um levantamento bibliográfico, seguido da cotação desses mesmos antígenos em diferentes empresas comerciais para posterior aquisição.

Os acoplamentos dos antígenos foram realizados nas microesferas MagPlex (Luminex Corporation) de poliestireno cobertas por nanopartículas magnéticas, compostas por conjuntos espectrais distintos que permitem a identificação individual de cada microesfera no equipamento MagPix®.

Os acoplamentos foram realizados de forma individual para cada antígeno escolhido, com diferentes concentrações a fim de identificar a melhor condição de acoplamento. Os acoplamentos foram realizados seguindo o protocolo disponibilizado pela empresa Luminex Corporation. (xMAP® Cookbook 5ª Edição). Primeiramente foram adicionadas as soluções de microesferas magnéticas xMAP® em diferentes tubos USA de baixa adesão (catálogo 1415-2600). Foram utilizadas as microesferas 12 (MC10012), 45 (MC10045) e 72 (MC10072) para os antígenos de *Toxoplasma gondii*, Rubéola e Citomegalovírus respectivamente. As microesferas foram lavadas com NaH₂PO₄ (tampão de ativação) e incubadas com EDC e Sulfo NHS durante 20 minutos protegidas da luz e sobre rotação em shaker agitador de tubos a 700 rpm. Em seguida as microesferas foram lavadas com tampão contendo PBS pH 7.4, Tween20, Albumina e Azida 20% (PBS-TBN) e incubadas com os respectivos antígenos durante 2h. Após a incubação, as

microesferas foram lavadas novamente e mantidas sobre rotação por 20 minutos com tampão de bloqueio contendo 1% de Albumina (BSA) (PBS/1%BSA). Em seguida as microesferas foram centrifugadas e ressuspensas em tampão PBS-TBN e armazenadas sobre refrigeração.

4.2 Desempenho dos antígenos acoplados na metodologia multiplex

Foi realizado o ensaio Multiplex para análise do desempenho dos acoplamentos dos diferentes antígenos às microesferas. Todos os ensaios foram realizados com as amostras em triplicata. Para isso foram utilizadas amostras caracterizadas como positivas e negativas para os três parâmetros adquiridos da empresa Seracare Life Science. Abaixo o protocolo de ensaio utilizado:

- **Protocolo de ensaio**

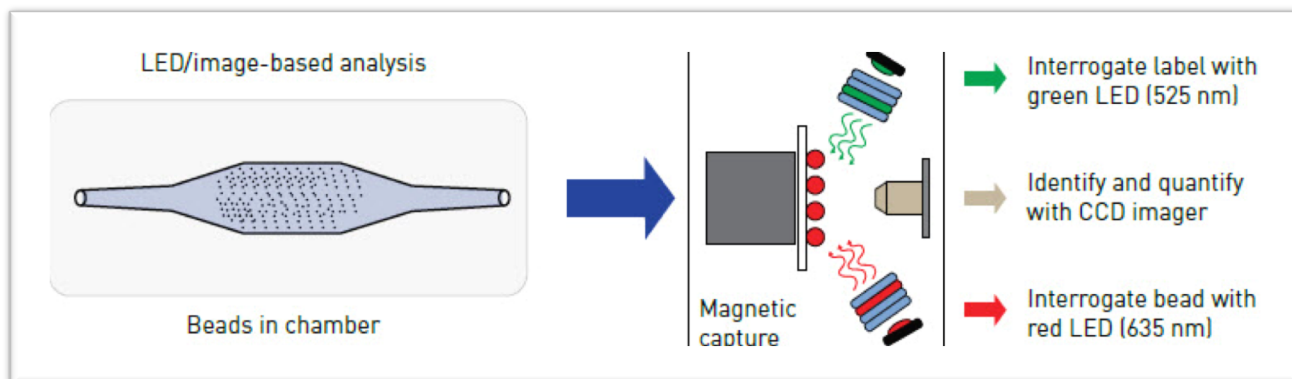
Primeiramente as amostras foram eluidas em tubos de 1.5 ml com 200 µL de Reagente de Eluição (PBS, Tween20, Azida 20%, BSA e extrato de *E. coli*) na diluição de 1:200 por 60 minutos sobre agitação no shaker de placas a 700 rpm.

Após a incubação foi preparada a placa de ensaio adicionando 25 µL do pool de microesferas magnéticas acopladas a antígenos de Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovírus em cada poço. Em seguida foi realizada uma etapa de lavagem adicionando 50 µL de Solução de lavagem (PBS, Tween 20 e Azida 20%). E então adicionado 50 µL do eluato em cada poço da placa de ensaio e realizada uma incubação de 90 minutos a 700 rpm protegido da luz. Após a incubação foram realizadas duas etapas de lavagens e adicionado 50 µL de solução de Anti-IgM humano marcado com Biotina por 30 minutos a 700 rpm e protegido da luz. Após a incubação foi realizada uma nova etapa de lavagem e adicionado 50 µL da Solução de Ficoeritrina conjugada com Streptavidina mantida sobre agitação por 30 minutos a 700 rpm. Em seguida foi retirada a solução, adicionado 50 µL de Solução de Lavagem mantida por 1 minuto a 700 rpm e a placa levada para leitura no equipamento Magpix da empresa Luminex Corporation com análise no Software xPONENT®.

- **Equipamento de leitura Magpix**

A leitora Magpix caracteriza os resultados em intensidade de fluorescência média (MFI) após leitura de pelo menos 50 microesferas de cada categoria. O equipamento possui dois LEDs, um para classificação das microesferas no comprimento de onda de 635 nm e outro para quantificação da sonda reporter em 525 nm. Em seu interior o equipamento possui uma câmera magnética que permite a aderência das microesferas, em seguida são retiradas imagens dessas microesferas nos respectivos comprimentos de onda. A figura 3 abaixo ilustra o funcionamento da tecnologia.

Figura 3: Tecnologia de leitura do equipamento Magpix da empresa Luminex Corporation.



Fonte: Angeloni, 2022.

4.3 Validação do kit em desenvolvimento

Após a definição dos antígenos a serem utilizados e da melhor metodologia de ensaio, foram realizados os estudos de desempenho necessários para validação e registro do kit em desenvolvimento na ANVISA. Para isso foram realizados os ensaios descritos na RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 (BRASIL, 2017), sendo eles:

- ROC;
- Exatidão;
- Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade);
- Linearidade;

- Alta dose;
- Sensibilidade analítica (Limite mínimo de detecção – LMD);
- Especificidade analítica;
- Robustez;
- Estabilidade acelerada e a longo prazo.

4.3.1 Análise ROC

Foi realizado ensaio com um painel de amostras caracterizadas por outra metodologia de ensaio (ELISA) para cada parâmetro. Após o ensaio foi realizada análise estatística no Software R com Análise ROC de cada parâmetro na plataforma multiplex. A análise ROC (Receiver operating characteristic) é uma representação gráfica do desempenho de um modelo de dados traçando sua sensibilidade (proporção de verdadeiros positivos) contra a proporção de falsos positivos (especificidade) para diferentes valores de testes. Essa análise disponibiliza valores de corte, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

4.3.2 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. No estudo a exatidão foi verificada por meio da comparação da classificação obtida na metodologia multiplex com o padrão outro existente no mercado (ELISA). Foi realizada análise estatística kappa para descrever a concordância entre dois ou mais métodos de análise, quando realizam uma avaliação nominal ou ordinal de uma mesma amostra. O valor de Kappa pode variar de $(-pe/1-pe)$ até um (1). Quanto mais próximo de um (1) for o valor, maior é o indicativo de que existe uma concordância entre os métodos e quanto mais próximo de zero, maior é o indicativo de que a concordância é puramente aleatória. No estudo os valores de kappa foram transformados em porcentagem.

4.3.3 Precisão de medição

Os testes de repetibilidade foram realizados no laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa Intercientífica, enquanto os testes de reprodutibilidade foram realizados no laboratório de Controle de Qualidade da mesma empresa onde todos os equipamentos e o operador eram distintos. Os ensaios foram realizados com nove amostras de reatividade, alta, média e baixa em triplicata.

4.3.4 Sensibilidade analítica (LMD)

Os limites de detecção foram calculados com a média de 73 valores do branco obtidos através do protocolo de ensaio com os resultados expressos em MFI. A análise estatística foi realizada no software *Action Stat* que apresentou os valores mínimos de detecção para cada parâmetro no ensaio multiplex.

4.3.5 Especificidade Analítica

Foi realizado o protocolo de ensaio utilizando os componentes do sangue após a separação do plasma a fim de verificar se ocorre interferência da matriz, isso porque é no plasma que os anticorpos se encontram. Foi verificado os valores de MFI da matriz após desconto do branco (MFI – background).

4.3.6 Linearidade

A linearidade do método foi verificada por meio de ensaios com amostras altamente positivas para cada parâmetro em diluição seriada 1:2 com 16 quedas. Após o ensaio foi realizada a análise de regressão linear em cada uma das amostras avaliando o coeficiente de regressão (R^2). A meta de desempenho definida foi de R^2 maior do que 0.99 de acordo com o critério de aceitação da ANVISA.

4.3.7 Alta dose

O efeito pró-zona de alta dose foi verificado com uso de amostras altamente reativas para os três antígenos. Foi realizado o ensaio com as amostras em diluição seriada 1:2 com 8 quedas iniciando na diluição das amostras em 1:10.

4.3.8 Robustez

Para verificar se pequenas alterações deliberadas em algumas etapas causam alteração na reatividade das amostras foram realizados ensaios com 10 minutos a mais e 10 minutos a menos do tempo normal de incubação de cada etapa do protocolo de ensaio, sendo elas eluição das amostras, incubação com as microesferas, incubação com o Anti-IgM humano e incubação com a ficoeritrina. O critério de aceitação foi de CV menor que 20% entre as amostras com diferentes tempos de incubação quando comparadas a referência (tempo original de cada etapa).

4.3.9 Estabilidade Acelerada

Para o estudo de estabilidade acelerada foram produzidos três lotes de forma independente mantidos em estufa a 37°C durante 15 dias. Foram realizados ensaios a cada 3 dias, totalizando 6 ensaios para cada lote. Os ensaios foram realizados logo após a produção (dia zero) e nos dias 3, 6, 9, 12 e 15 após produção. As análises foram realizadas no Software estatístico Action Stat, sendo que foi utilizado o intervalo de confiança de 95%. Os dados obtidos foram analisados no Software estatístico *Action Stat* com análise de regressão linear a fim de identificar o *p-value*. Foi considerado perda de estabilidade $p < 0.05$ ao comparar os valores de MFI ao longo dos dias. A análise estatística foi realizada para cada parâmetro na metodologia de ensaio multiplex com os valores de MFI dos três lotes produzidos.

4.3.10 Estabilidade a longo prazo

Para o estudo de estabilidade a longo prazo foram produzidos três lotes divididos em dois kits cada, um para estudo de estabilidade em uso normal e outro para simulação de expedição e envio, totalizando seis kits.

Os kits em uso normal foram produzidos e deixados na bancada a 25°C após a produção por duas horas. Passado esse período os kits foram armazenados sobre refrigeração de 2 a 8°C sendo retirado apenas para os ensaios.

Os kits em simulação de expedição e envio foram mantidos na bancada a 25°C por duas horas a fim de simular a expedição e depois em ambiente com variação de temperatura de 20 a 30°C por três dias a fim de simular o transporte. Passado esse período o kit foi armazenado sobre refrigeração com variação de temperatura de 2 a 8°C sendo retirado apenas para os ensaios.

Foram realizados ensaios semanais no primeiro mês e em seguida ensaios a cada 2 meses até completar dois anos ou perda de estabilidade com CV maior que 15% por dois ensaios consecutivos. Apesar da finalização do mestrado o estudo irá permanecer na empresa Intercientífica.

4.4 Amostras biológicas

Caracterização e validação de amostras clínicas utilizadas: as amostras utilizadas no estudo de desempenho podem ser divididas em dois grupos. Um grupo é de amostras de referência para estudo de sensibilidade analítica, especificidade analítica, efeito pró-zona e linearidade. Estas amostras são o painel Seracare de anticorpos contra *T. gondii* (AccuSet™ Toxoplasmosis Performance Panel, número de catálogo 0820-0321, lote 10344475), amostra portadora de anticorpos IgM contra Rubéola (Seracare Rubella IgM positive plasma, número de catálogo DS-674-M, lote 9254456), e amostra portadora de anticorpos IgM contra CMV (Seracare CMV IgM Positive plasma, número de catálogo DS-626-M, lote BM217341). Ambas as amostras foram fornecidas com valores de

referência para linearidade. O outro grupo de amostras foi utilizado no estudo sobre exatidão, precisão, definição de *cut-off* e estabilidade. Estas amostras comerciais foram adquiridas já caracterizadas quanto a presença ou ausência de anticorpos da classe IgM por meio da técnica de ELISA comercial, os dados se encontram no certificado de análise fornecido junto com as amostras.

As amostras de referências de RUB, CMV e o painel de amostras de TOXO, foram adquiridas em plasma congelado da empresa Seracare Life Science. Um painel de amostras de TOXO, RUB e CMV foi fornecido no formato de sangue seco em papel filtro (DBS). Já foi demonstrado, na literatura científica, que o formato das amostras (sangue total, soro, plasma ou sangue seco em papel) não causa diferenças nos resultados de reatividades quando se mantém o fator de diluição (BOA-SORTE *et al.*, 2014; MINUZZI *et al.*, 2008). No presente estudo a diluição das amostras utilizadas são de 1:200, sendo mantido o fator quando em sangue total impregnado em papel filtro (1 picote em 250ul de eluição) quanto em soro (1ul de plasma/soro em 200ul de eluição).

4.5 Análise dos resultados

Em todos os ensaios foi verificada a constante de variação (CV) entre as replicatas de cada amostra. Para isso sfoi utilizada a fórmula da Constante de Variação (CV) = Desvio Padrão / Média x 100. Além disso foram utilizados os softwares *GraphPad Prisma* e *Action Stat* para análise dos dados específicos de desempenho estabelecidos pela ANVISA.

5 RESULTADOS

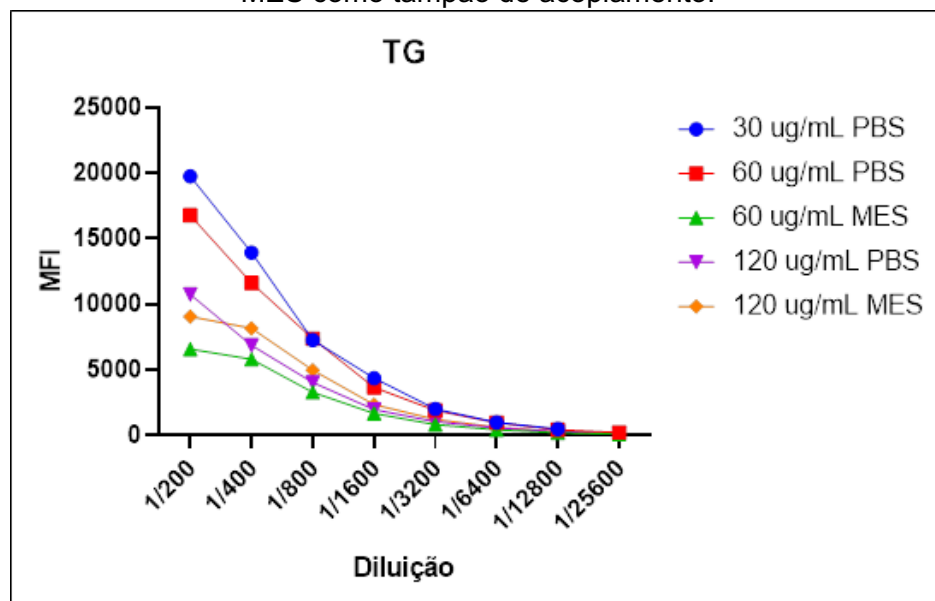
5.1 Escolha e acoplamento dos antígenos

- *Toxoplasma Gondii*

Foram realizados ensaios utilizando a amostra Seracare IgM positiva (Seracare IgM positive plasma catálogo DS-674-M) para toxoplasmose em diluição seriada iniciando em 1:200 a fim de verificar a reatividade dos acoplamentos realizados. Foram testados no total quatro antígenos diferentes.

Na figura 4 é possível observar o antígeno TG nas concentrações de 30, 60 e 120 µg/ml utilizando PBS e MES como tampão de acoplamento. As concentrações de 60 e 120 µg/mL apresentaram menor reatividade quando comparado ao TG a 30 µg/mL com PBS, indicando efeito de alta dose em acoplamentos com maiores concentrações de antígeno. Além disso, o uso do PBS como tampão de acoplamento obteve maior reatividade em todas as concentrações quando comparado ao MES.

Figura 4 : Valores de MFI do antígeno TG com diferentes concentrações e utilizando PBS e MES como tampão de acoplamento.

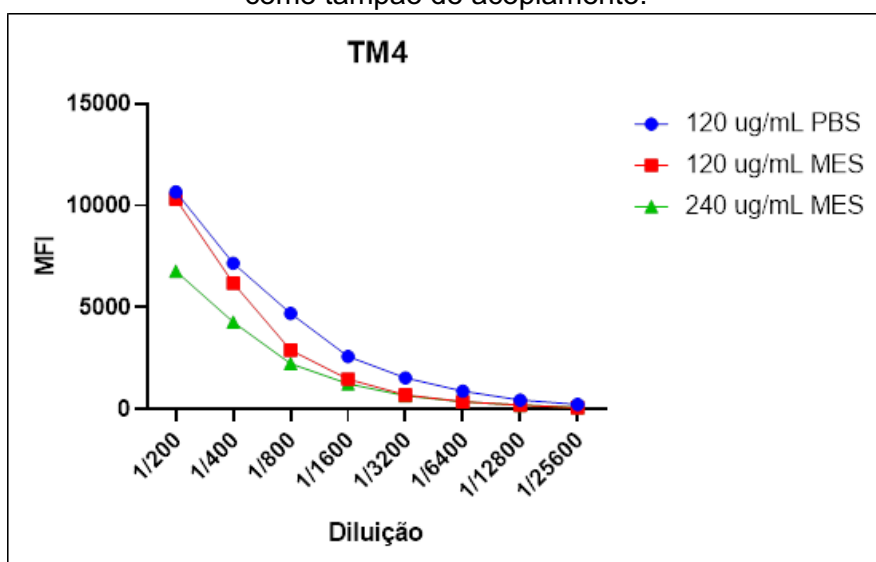


Fonte: Próprio Autor.

Na figura 5 é possível observar a reatividade do antígeno TM4 acoplado a 120 e 240 µg/ml com PBS e MES. O acoplamento a 120 µg/mL com PBS apresentou maior reatividade quando comparado as outras concentrações, porém o MFI máximo do antígeno foi 10671.5 MFI na diluição de 1:200, enquanto o antígeno TG a 30 µg/mL obteve 19745.8 MFI na mesma diluição.

O mesmo ocorreu com o antígeno TM3 (Figura 6) que apesar do bom desempenho obteve 12960 MFI na diluição de 1:200, reatividade menor e com uma concentração maior do que o antígeno TG.

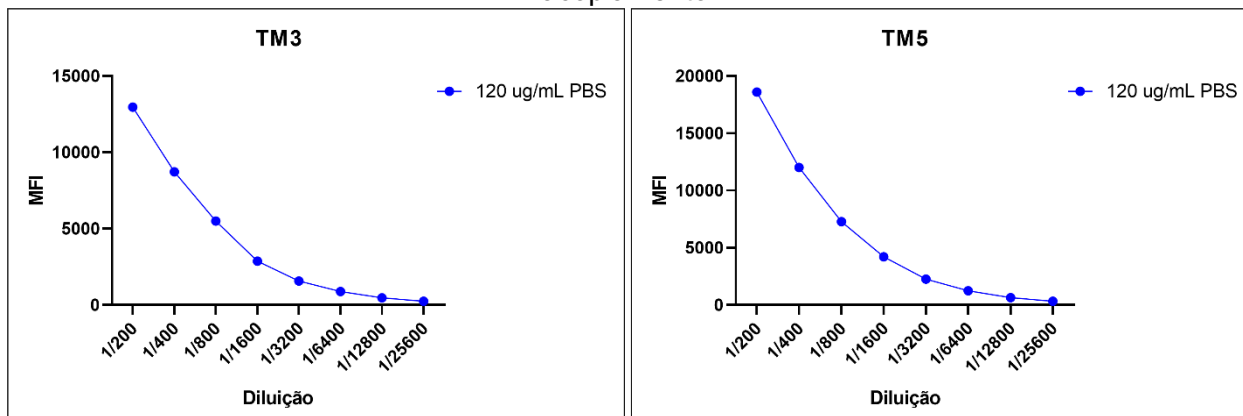
Figura 5: Valores de MFI do antígeno TM4 com diferentes concentrações utilizando PBS e MES como tampão de acoplamento.



Fonte: Próprio Autor.

O antígeno TM5 (Figura 6) apresentou reatividade de 18588 MFI na diluição de 1:200, valor semelhante ao antígeno TG porém com uma concentração maior. Além disso, o antígeno foi descontinuado pela empresa que comercializa e por isso não será mais utilizado para novos testes.

Figura 6: Valores de MFI do antígeno TM3 e TM5 a 120 µg/mL utilizando PBS como tampão de acoplamento.



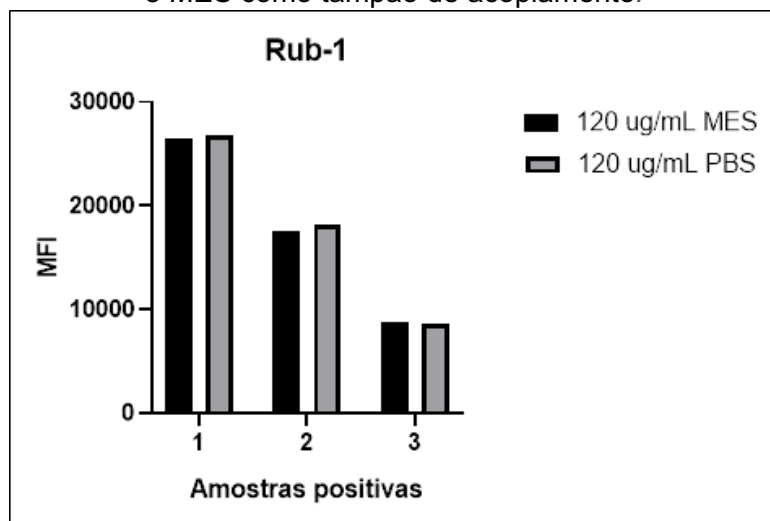
Fonte: Próprio Autor.

O antígeno escolhido para os próximos ensaios na detecção de anticorpos IgM contra Toxoplasmose foi o TG a 30 µg/mL com PBS como tampão de acoplamento.

- **Rubéola (RUB)**

Para o parâmetro de RUB foram testados quatro antígenos com diferentes concentrações e tampões de acoplamento. O primeiro antígeno testado foi o RUB-1 a 120 µg/mL com PBS e MES. Em ambos os tampões o antígeno apresentou alta reatividade nas amostras positivas e baixa nas negativas (Figura 7).

Figura 7: Valores de MFI do antígeno RUB-1 acoplado na concentração de 120 µg/mL com PBS e MES como tampão de acoplamento.

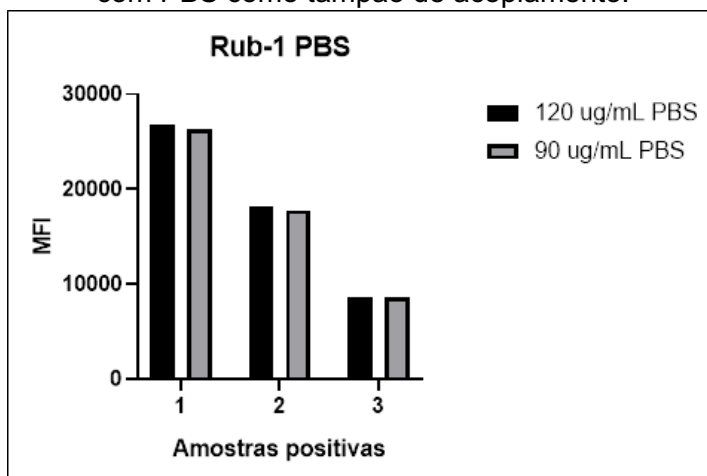


Fonte: Próprio Autor.

Devido a alta reatividade apresentada em todas as amostras e valores de MFI semelhantes em ambos os tampões, foi utilizado PBS como tampão de acoplamento.

Para o acoplamento seguinte do antígeno RUB-1 foram escolhidas as concentrações de 120 e 90 µg/mL (Figura 8) e em ambas a reatividade foi semelhante com CV menor que 15% entre as medianas.

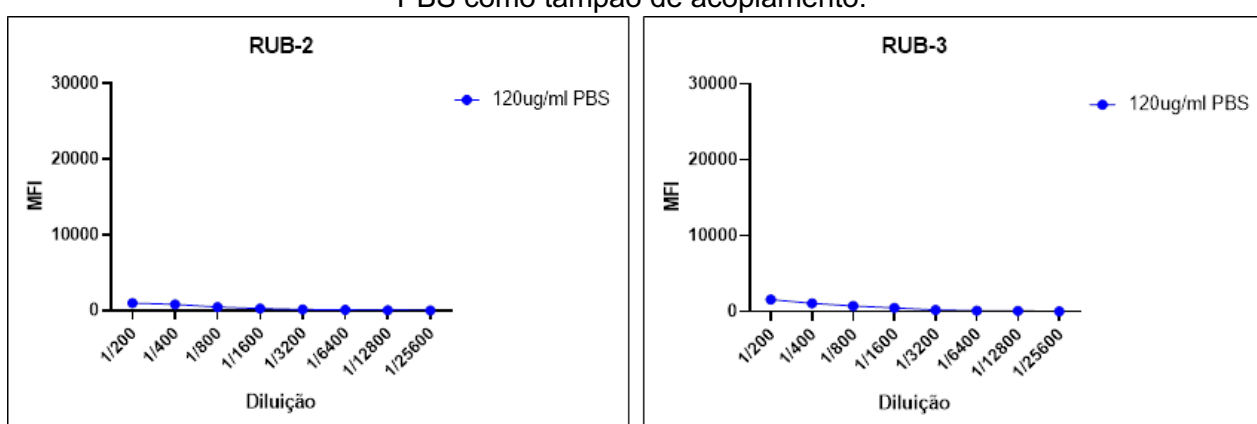
Figura 8: Valores de MFI do antígeno RUB-1 acoplados nas concentrações de 120 e 90 µg/mL com PBS como tampão de acoplamento.



Fonte: Próprio Autor.

Outros antígenos também foram testados, como o RUB-2 e RUB-3, porém os mesmos não obtiveram bom desempenho com baixa reatividade nas amostras positivas. Na figura 9 é possível observar que a reatividade máxima na diluição de 1:200 foi 995 e 1580 MFI para RUB-2 e RUB-3 respectivamente. Nos gráficos abaixo não foram adicionadas as amostras negativas pela baixa reatividade em todos os antígenos (Figuras 9 e 10).

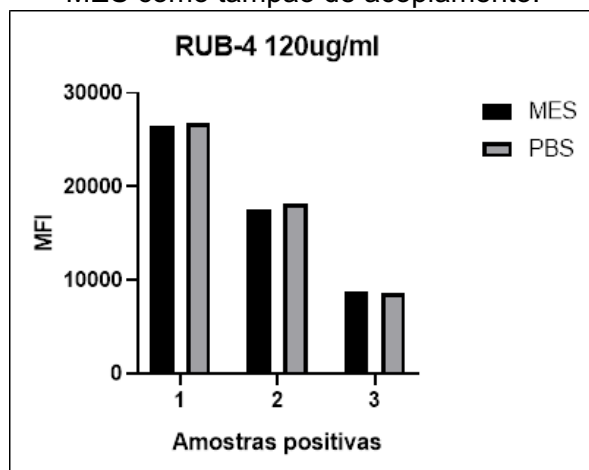
Figura 9: Valores de MFI do RUB-2 e RUB-3 acoplados na concentração de 120 µg/mL com PBS como tampão de acoplamento.



Fonte: Próprio Autor.

Na figura 10 é possível observar a reatividade do antígeno RUB-4 a 120 µg/mL com PBS e MES. Ambos apresentaram reatividades semelhantes, com CV menor que 15% entre as medianas.

Figura 10: Reatividade do antígeno RUB-4 acoplado na concentração de 120 µg/mL com PBS e MES como tampão de acoplamento.

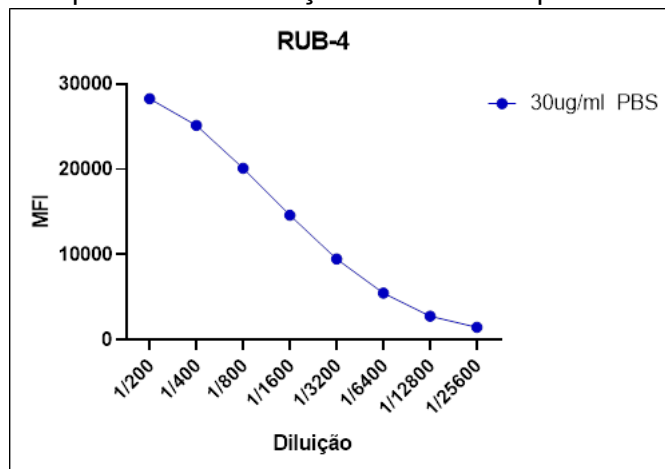


Fonte: Próprio Autor.

Como ambos os tampões apresentaram resultados semelhantes, foi escolhido o PBS como tampão de acoplamento devido a facilidade de obtenção.

Na figura 11 é possível observar a reatividade do RUB-4 a 30 µg/mL com PBS em diluição seriada. Na diluição de 1:200 a reatividade foi de 28262 MFI utilizando a amostra padrão de rubéola.

Figura 11: Reatividade do antígeno RUB-4 acoplado na concentração de 30 µg/mL com PBS como tampão de acoplamento em diluição seriada de 8 quedas iniciando em 1/200.



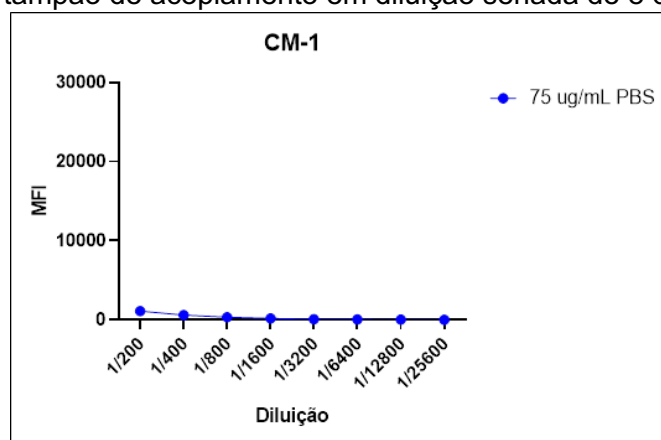
Fonte: Próprio Autor.

Apesar do bom desempenho apresentado no antígeno RUB-1 a 90 µg/mL o antígeno RUB-4 foi escolhido para os ensaios de desempenho devido a maior reatividade em menor concentração (30 µg/mL).

- **Citomegalovírus (CMV)**

Foram testados no total dez antígenos para CMV. Primeiramente foi testado o antígeno CM-1 na concentração de 75 µg/mL com PBS em diluição seriada com a amostra CMV IgM positivo da Seracare. Na figura 10 é possível observar que na diluição de 1:200 o antígeno obteve baixa reatividade com MFI máximo de 1120 e por isso não foi mais utilizado para novos testes.

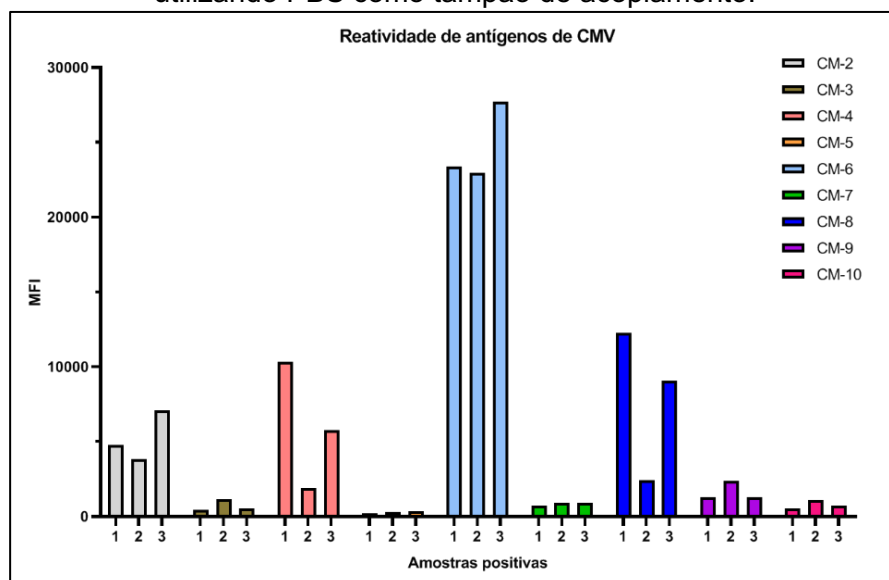
Figura 12: Reatividade do antígeno CM-1 acoplado na concentração de 75 µg/mL com PBS como tampão de acoplamento em diluição seriada de 8 quedas.



Fonte: Próprio Autor.

Em seguida foram realizados acoplamentos a 120 µg/mL com PBS para nove antígenos diferentes adquiridos de empresas comerciais. Para análise do desempenho dos acoplamentos foram utilizadas três amostras positivas e três negativas para anticorpos IgM contra citomegalovírus. Nos gráficos abaixo não foram adicionados as amostras negativas pela baixa reatividade em todos os antígenos. É possível observar na figura 13 maior reatividade nas amostras positivas nos antígenos CM-2, CM-4, CM-6 e CM-8 quando comparado aos demais.

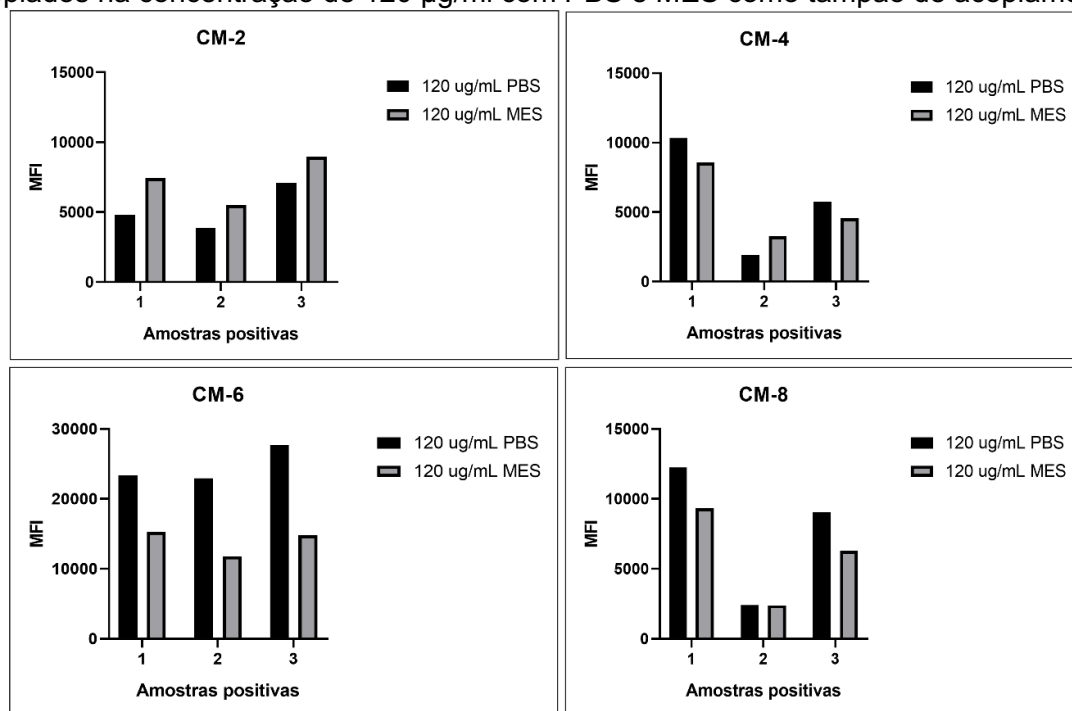
Figura 13: Reatividade dos antígenos de CMV acoplados na concentração de 120 µg/mL utilizando PBS como tampão de acoplamento.



Fonte: Próprio Autor.

Na figura 14 os antígenos CM-2, CM-4, CM-6 e CM-8, que apresentaram melhor desempenho, foram acoplados a 120 µg/mL com MES para comparar a reatividade dos diferentes tampões de acoplamento.

Figura 14: Comparação da reatividade dos antígenos CM-2, CM-4, CM-6 e CM-8 de CMV acoplados na concentração de 120 µg/ml com PBS e MES como tampão de acoplamento.



Fonte: Próprio Autor.

O antígeno CM-2 apresentou maior reatividade nas amostras positivas com MES, porém esse aumento também ocorreu de forma significativa nas amostras negativas e por isso o antígeno não foi mais utilizado. Os antígenos CM-4, CM-6 e CM-8 apresentaram maior reatividade com PBS e serão utilizados para os próximos ensaios.

5.2 Análise ROC – Multiplex

Para verificar o desempenho dos antígenos escolhidos na plataforma multiplex foi realizado ensaio com amostras sabidamente positivas e negativas para Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovírus.

Os dados analisados no programa estatístico R demonstraram alta sensibilidade e especificidade para todos os parâmetros na plataforma multiplex.

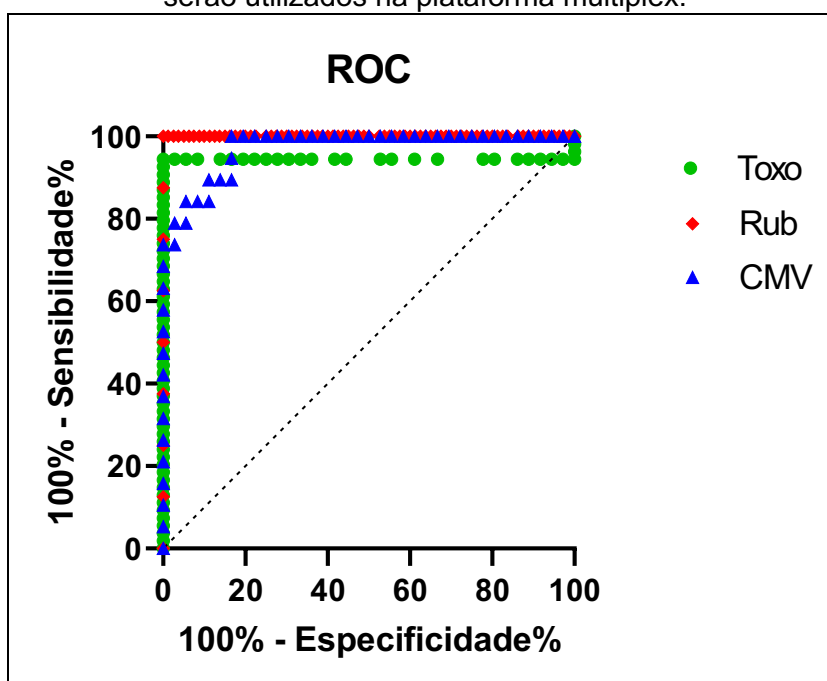
Tabela 1: Dados ROC para os antígenos de TG, RUB-4 e CM-6.

	TG	RUB-4	CM-6
Cut-off	303	3192	983
Sensibilidade	98%	100%	100%
Especificidade	100%	100%	83%
FP	0	0	6
FN	1	0	0
VPN	97	100	100
VPP	100	100	76
AUC	98%	100	97%
IC	94%-100%		94%-100%
Acuracia	99	100	89

Fonte: Próprio Autor.

A figura 15 abaixo demonstra a área sob a curva dos parâmetros testados na plataforma multiplex. Possível observar alta sensibilidade e especificidade nos antígenos escolhidos para serem utilizados (TG, RUB-4 e CM-6).

Figura 15: Análise ROC dos antígenos com melhor desempenho de Toxo, Rub e CMV que serão utilizados na plataforma multiplex.



Fonte: Próprio Autor.

5.3 Exatidão

Por se tratar de método semi-quantitativo, mas que os resultados serão expressos de forma qualitativa (positivo e negativo), a exatidão foi verificada comparando resultados de 88 amostras de Toxo, 88 amostras de Rub e 55 amostras de CMV. Estas amostras foram previamente caracterizadas como positivas ou negativas em um segundo kit comercial (BIO-RAD Platelia) para comparação com os resultados obtidos no estudo. Dentre estas amostras constavam amostras negativas, positivas altas, médias e baixas.

Abaixo estão resultados indicando a quantidade de amostras que foram classificadas de forma concordante e discordante no nosso produto e na segunda metodologia (tabela 2).

Tabela 2: Dados de exatidão dos parâmetros de TOXO, RUB e CMV na plataforma multiplex.

TOXO	ELISA positivo	ELISA negativo	Total
<i>TOXO/RUB/CMV IgM Positivo</i>	52	0	52
<i>TOXO/RUB/CMV IgM negativo</i>	1	35	36
			88
Concordantes		87	99%
Discordantes		1	1%
RUB	ELISA positivo	ELISA negativo	Total
<i>TOXO/RUB/CMV IgM Positivo</i>	8	0	8
<i>TOXO/RUB/CMV IgM negativo</i>	0	80	80
			88
Concordantes		80	100%
Discordantes		0	0%
CMV	ELISA positivo	ELISA negativo	Total
<i>TOXO/RUB/CMV IgM Positivo</i>	19	0	19
<i>TOXO/RUB/CMV IgM negativo</i>	6	30	36
			55
Concordantes		49	89%
Discordantes		6	11%

Fonte: Próprio Autor.

Por meio dos resultados apresentados nas tabelas é possível verificar que o kit multiplex TOXO/RUB/CMV apresentou exatidão de 99% no parâmetro de Toxo, 100% para Rub e 89% para CMV.

Apesar de ocorrer algumas discordâncias, todas estas amostras discordantes estão próximas ao valor de corte nas duas metodologias utilizadas, e discordâncias nestas condições podem ocorrer com qualquer metodologia comparada.

5.4 Repetibilidade

O ensaio de repetibilidade apresentou CV menor que 15% em todas as amostras demonstrando que não há diferença significativa entre as triplicatas para todos os parâmetros analisados.

Apesar do critério de aceitação utilizado ter sido de 15%, é comum amostras de baixa reatividade apresentarem desvio padrão relativo acima do preconizado devido a variabilidade intrínseca do método resultante do alto alcance dinâmico (0-100.000MFI).

Na tabela 3 abaixo estão os resultados em intensidade fluorescente média (MFI) de nove amostras contemplando amostras de reatividade alta, média e baixa. De cada amostra foram preparadas três réplicas independentes.

Tabela 3- Resultados do operador 1 com mediana, desvio padrão e desvio padrão relativo de nove amostras analisadas com o kit TOXO/RUB/CMV IgM (M- Mediana, DP- desvio padrão DPR-desvio padrão relativo).

TOXO						
Amostra	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	M	DP	CV (%)
Amostra 1	25737	27455	27450	27450	809	3
Amostra 2	22508	25824	26491	25824	1742	7
Amostra 3	8076	8626	8785	8626	304	3
Amostra 4	3331	3929	4326	3929	409	10
Amostra 5	2737	3514	3644	3513	400	11
Amostra 6	3476	2967	3163	3163	210	7
Amostra 7	370	376	319	370	26	7
Amostra 8	346	336	324	336	9	3
Amostra 9	287	203	254	254	34	13

RUB						
Amostra	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	M	DP	CV (%)
Amostra 1	28094	30167	30621	30167	1100	4
Amostra 2	26494	26115	25568	26115	380	1
Amostra 3	20084	22046	21360	21360	813	5

<i>Amostra 4</i>	15956	14871	15745	15745	470	3
<i>Amostra 5</i>	10074	10350	9518	10074	346	3
<i>Amostra 6</i>	6011	5815	5762	5815	107	2
<i>Amostra 7</i>	3171	3113	2856	3113	137	4
<i>Amostra 8</i>	1584	1542	1122	1542	209	13
<i>Amostra 9</i>	773	732	668	732	43	6

CMV

Amostra	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	M	DP	CV (%)
<i>Amostra 1</i>	14934	15109	14604	14934	210	1
<i>Amostra 2</i>	12386	12066	12469	12386	174	1
<i>Amostra 3</i>	11111	12947	12580	12580	793	6
<i>Amostra 4</i>	7422	7575	7471	7471	64	1
<i>Amostra 5</i>	7546	8394	8094	8094	351	4
<i>Amostra 6</i>	4402	4812	4066	4402	305	7
<i>Amostra 7</i>	1236	1156	1151	1156	39	3
<i>Amostra 8</i>	896	892	869	891	11	1
<i>Amostra 9</i>	579	569	580	579	5	1

Fonte: Próprio Autor.

5.5 Reprodutibilidade

Na tabela 4 abaixo estão os resultados em intensidade fluorescente média das mesmas nove amostras utilizadas no laboratório 1, contemplando amostras de reatividade alta, média e baixa. Três replicatas de cada amostra foram preparadas de forma independente.

Possível observar CV no geral menor que 15% em todos os parâmetros ao comparar os ensaios realizados por dois operadores em dois laboratórios distintos. Maior variabilidade apenas nas amostras de baixa reatividade.

Tabela 4: Resultados dos laboratórios 1 e 2 com mediana, desvio padrão e desvio padrão relativo de nove amostras analisadas com kit TOXO/RUB/CMV IgM (M- Mediana, DP- desvio padrão DPR-desvio padrão relativo, Op- operador, Lab- laboratório).

TOXO

Amostra	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	M lab 2	DP	DPR	M lab 1	M Lab 1 vs Lab 2	DP	CV (%)
<i>Amostra 1</i>	22495	23908	22571	22571	649	3	27450	25010	2440	10
<i>Amostra 2</i>	22222	23608	24019	23608	769	3	25824	24716	1108	4
<i>Amostra 3</i>	8021	7750	7951	7951	115	1	8626	8288	338	4
<i>Amostra 4</i>	4158	4277	4107	4158	71	2	3929	4043	114	3
<i>Amostra 5</i>	2761	2775	2446	2761	152	5	3514	3137	377	12
<i>Amostra 6</i>	2616	2536	2326	2536	122	5	3163	2849	314	11
<i>Amostra 7</i>	639	646	672	647	14	2	724	685	39	6
<i>Amostra 8</i>	323	302	325	323	11	3	370	347	24	7
<i>Amostra 9</i>	352	380	308	352	30	8	336	344	8	2

RUB

Amostra	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	M lab 2	DP	DPR	M lab 1	M Lab 1 vs Lab 2	DP	CV (%)
Amostra 1	33277	36123	32433	33277	1579	5	30167	31722	1555	5
Amostra 2	28718	30542	29543	29543	746	3	26115	27829	1714	6
Amostra 3	24138	24113	23756	24113	174	1	21360	22736	1376	6
Amostra 4	18332	16409	18236	18236	885	5	15745	16990	1245	7
Amostra 5	12423	12187	12073	12187	146	1	10074	11130	1056	9
Amostra 6	7573	6998	7270	7270	235	3	5815	6543	727	11
Amostra 7	3844	3891	3921	3891	32	1	3113	3502	389	11
Amostra 8	1868	1852	1545	1852	148	8	1542	1697	155	9
Amostra 9	934	868	828	868	44	5	732	800	68	8

CMV

Amostra	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	M lab 2	DP	DPR	M lab 1	M Lab 1 vs Lab 2	DP	CV (%)
Amostra 1	15154	14815	14775	14815	170	1	12386	13601	1214	9
Amostra 2	13316	16048	16051	16048	1289	8	12580	14314	1734	12
Amostra 3	12101	12565	12182	12182	203	2	11259	11720	462	4
Amostra 4	6373	6591	6306	6373	122	2	7471	6922	549	8
Amostra 5	9202	8711	8484	8711	300	3	8094	8402	308	4
Amostra 6	5041	4784	4372	4784	275	6	4402	4593	191	4
Amostra 7	3385	3243	3306	3306	58	2	2771	3038	268	9
Amostra 8	1188	1071	1115	1115	48	4	1156	1135	20	2
Amostra 9	510	526	479	510	19	4	579	544	34	6

Fonte: Próprio Autor.

5.6 Sensibilidade Analítica (LMD)

Em todos os parâmetros houve baixa reatividade no branco, indicando que não ocorre reatividade indesejada do tampão de eluição e lavagem com as microesferas acopladas aos diferentes antígenos, como demonstrado na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5: Limite de detecção em MFI do kit TOXO/RUB/CMV IgM.

Resultados do Limite de Detecção (LD)			
	Valores de TOXO	Valores de RUB	Valores de CMV
<i>Média</i>	36	49	41
<i>Desvio Padrão</i>	4	9	4
<i>Graus de Liberdade</i>	71	71	71
Limite de Detecção	43	65	47

Fonte: Próprio Autor.

5.7 Especificidade Analítica

A especificidade analítica foi demonstrada com o uso de amostras contendo os componentes do sangue após separação do plasma, isso porque é no plasma que os anticorpos se encontram.

Abaixo consta a tabela 6 de reatividade em MFI de amostra contendo os componentes do sangue menos o plasma. Pode-se verificar que na análise da reatividade dos componentes do sangue não há anticorpos e está abaixo dos limites de detecção de todos os parâmetros, indicando que não ocorre reatividade significativa destes componentes.

Tabela 6- Reatividade da amostra contendo componentes do sangue após separação de plasma.

	TOXO	RUB	CMV
Replica 1	2	0	0
Replica 2	0	-4	-5
Replica 3	1	1	-4

Fonte: Próprio Autor.

5.8 Alta dose

O efeito pró-zona de alta dose foi verificado com uso de amostras altamente reativas para os três antígenos. Abaixo estão tabelas com reatividade (em MFI) das amostras de acordo com as concentrações.

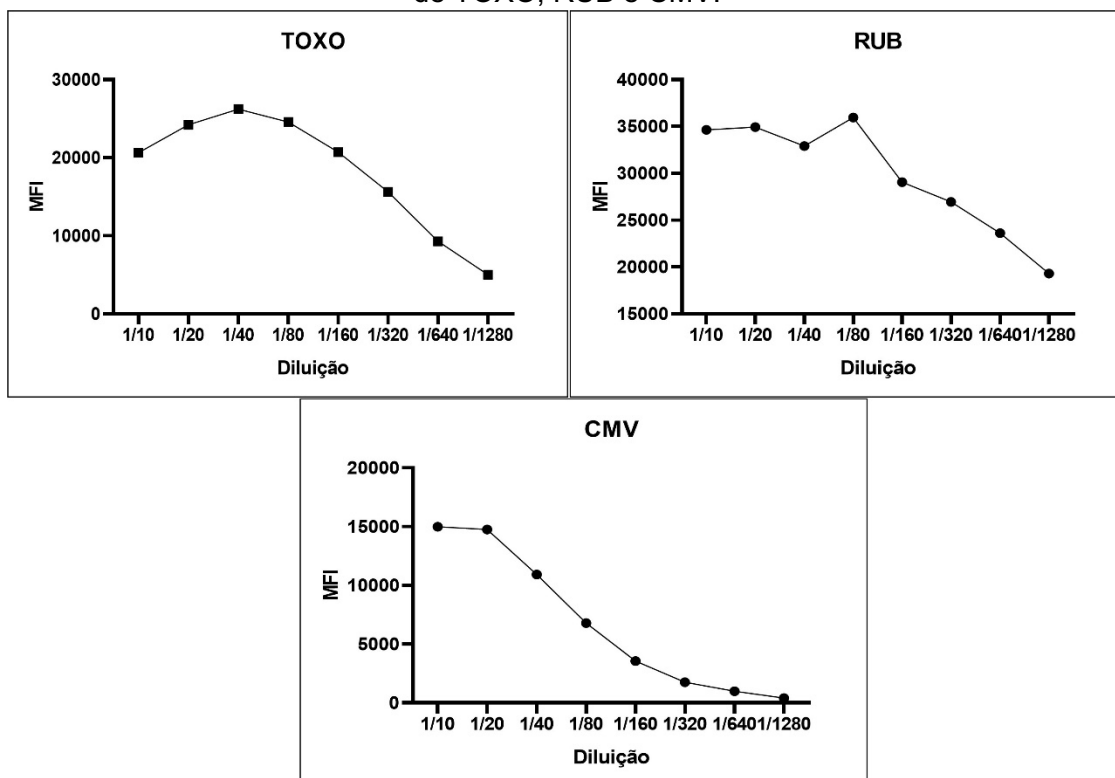
Tabela 7: Reatividade de amostras em diluições e 1/10 a 1/1280 para demonstrar efeito de alta dose nos parâmetros de Toxo, Rub e CMV.

Diluição	TOXO	RUB	CMV
1\10	20631	34629	14988
1\20	24208	34928	14753
1\40	26220	32901	10931
1\80	24566	35940	6786
1\160	20714	29058	3556
1\320	15608	26951	1757
1\640	9284	23618	993
1\1280	5013	19299	410

Fonte: Próprio Autor.

Na figura 16 é possível visualizar que no parâmetro de TOXO ocorre efeito de alta dose a partir da diluição de 1/40, causando diminuição da reatividade mesmo com maior concentração de anticorpos. No parâmetro de RUB ocorre o efeito de alta dose a partir da diluição de 1/160. No parâmetro de CMV o efeito de alta dose começa a ser percebido na diluição de 1/20.

Figura 16: Curva de reatividade das amostras em relação ao fator de diluição nos parâmetros de TOXO, RUB e CMV.



Fonte: Próprio Autor.

5.9 Linearidade

A faixa onde a resposta é linear se situa entre 15 a 10.000 MFI com R^2 e correlação em 0.99 para TOXO, 170 a 3.000 MFI com R^2 e correlação de 0.99 para RUB e 10 a 6.000 MFI com R^2 e correlação em 0.99 para CMV. Nos valores de MFI acima ou abaixo destas faixas o teste não é capaz de correlacionar MFI com a unidade de concentração das amostras.

5.10 Robustez

Foi realizado o teste de robustez, para verificar se pequenas alterações deliberadas em algumas etapas causam alteração na reatividade das amostras. A seguir estão descritos as alterações estudadas e o resultado das mesmas. (Todos os testes foram preparados em triplicata e os resultados apresentados correspondem a mediana das mesmas).

- 1- **Tempo de incubação de amostras.** No protocolo original o tempo de incubação é de 90 minutos. Para este teste, incubações com 10 minutos a mais e a menos foram testadas. Na tabela 8 abaixo estão valores de MFI resultante deste teste.

Tabela 8: Reatividade em incubação de amostras a 80, 90 e 100 min.

TOXO	80min	90min	100min	Med.	desv.P.	CV (%)
1	615	623	615	615	4	1
2	21279	22669	21397	21396	629	3
3	1610	1629	2080	1629	217	13
4	507	518	572	518	28	5
RUB	80min	90min	100min	Med.	desv.P.	CV (%)
1	27770	25990	26267	26267	782	3
2	181	249	222	222	28	13
3	329.5	389	423	389	38	10
4	53	65	60	60	5	8
CMV	80min	90min	100min	Med.	desv.P.	CV (%)
1	453	552	457	457	46	10
2	3033	4540	3222	3222	670	21
3	9208	9778	12205	9778	1299	13
4	300	411	382	382	47	12

Fonte: Próprio Autor.

- 2- **Tempo de incubação de anticorpo secundário.** No protocolo definido o tempo de incubação é de 30 minutos. Para este teste incubações com dez minutos a mais e a menos foram testadas. Na tabela abaixo estão valores de MFI resultante deste teste.

Tabela 9: Reatividade de amostras em incubação de anticorpo secundário a 20, 30 e 40 min.

TOXO	20min	30min	40min	Med.	desv.P.	CV (%)
1	640	623	698	640	32	5
2	18606	22669	22793	22669	1945	9
3	1717	1629	1907	1717	116	7
4	536	518	599	536	35	6
RUB	20min	30min	40min	Med.	desv.P.	CV (%)
1	25301	25990	27931	25989	1113	4
2	188	249	230	230	25	11
3	393	389	423	393	15	4
4	60	68	68	65	3	5
CMV	20min	30min	40min	Med.	desv.P.	CV (%)
1	493	552	508	507	25	5
2	2840	4540	4099	4098	720	18
3	10352	9778	10966	10351	485	5
4	386	411	419	411	14	3

Fonte: Próprio Autor.

- 3- **Tempo de incubação de revelador (Ficoeritrina).** No protocolo original o tempo de incubação é de 30 minutos. Para este teste incubações com 10 minutos a mais e a menos foram testadas. Na tabela abaixo estão valores de MFI resultante deste teste.

Tabela 10: Reatividade de amostras em incubação de Ficoeritrina a 20, 30 e 40 min.

TOXO	20min	30min	40min	Med.	desv.P.	CV (%)
1	727	623	566	623	67	11
2	19032	22669	22974	22669	1791	8
3	1803	1629	1816	1803	85	5
4	567	518	623	567	43	8
RUB	20min	30min	40min	Med.	desv.P.	CV (%)
1	25175	25990	28076	25990	1222	5
2	203	249	221	221	19	9
3	362	389	376	376	11	3
4	68	65	73	68	3	5
CMV	20min	30min	40min	Med.	desv.P.	CV (%)
1	519	552	456	518	40	8
2	3392	4540	4200	4200	482	12
3	9879	9778	12273	9879	1153	12
4	379	411	415	411	16	4

Fonte: Próprio Autor.

No presente estudo, foram realizados os testes de robustez de situações comuns no preparo da placa. Os estudos de robustez indicam que variações de 10 minutos mais ou a menos nas incubações não resultam em diferenças significativas na reatividade das amostras.

5.11 Estabilidade Acelerada

O objetivo deste estudo foi verificar se ocorre variação significativa na reatividade ao longo do tempo em temperatura elevada de 37°C (fora de armazenamento de 2° a 8°C). Abaixo as análises estatísticas de cada parâmetro.

- **Análise TOXO**

O teste de regressão linear para o parâmetro de TOXO apresentou estabilidade dos três lotes por 15 dias a 37°C com $p > 0.05$ ao comparar os valores de MFI ao longo dos dias.

- **Análise RUB**

O teste de regressão linear para o parâmetro de RUB apresentou perda de estabilidade antes de três dias a 37°C com $p < 0.05$ ao comparar os valores de MFI do dia zero com o dia três dos três lotes produzidos

- **Análise CMV**

O teste de regressão linear para o parâmetro de CMV apresentou estabilidade dos três lotes por 12 dias a 37°C com $p > 0.05$ ao comparar os valores de MFI ao longo dos dias (com 15 dias o teste indica haver diferença significativa com $p < 0.05$).

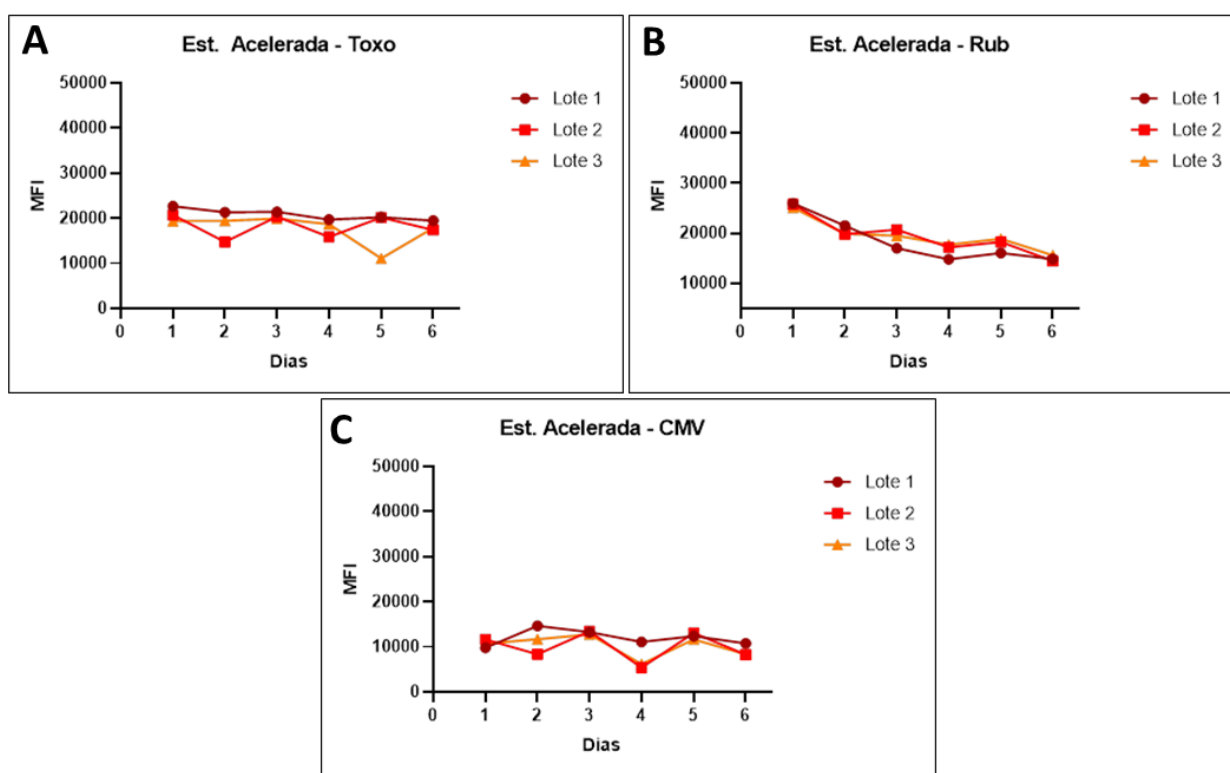
Resultados da Análise de Estabilidade Acelerada

No presente estudo o kit em desenvolvimento perdeu a estabilidade antes de três dias. Desta maneira os kits devem ser armazenados a temperatura entre 2°C a 8°C, e

devem ser expedidos e transportados em temperaturas entre 2°C a 25°C. A 37°C um dos parâmetros (RUB) apresentou variação significativa antes de três dias.

A figura 17 apresenta as variações dos valores de MFI dos três lotes em todos os parâmetros. Possível observar diminuição da reatividade no parâmetro de RUB a partir de três dias.

Figura 17: Gráficos da estabilidade acelerada dos três lotes piloto do kit TOXO/RUB/CMV IgM. A) análise do parâmetro de TOXO, B) Análise do parâmetro de RUB e C) Análise do parâmetro de CMV.



Fonte: Próprio Autor.

Estabilidade a longo prazo

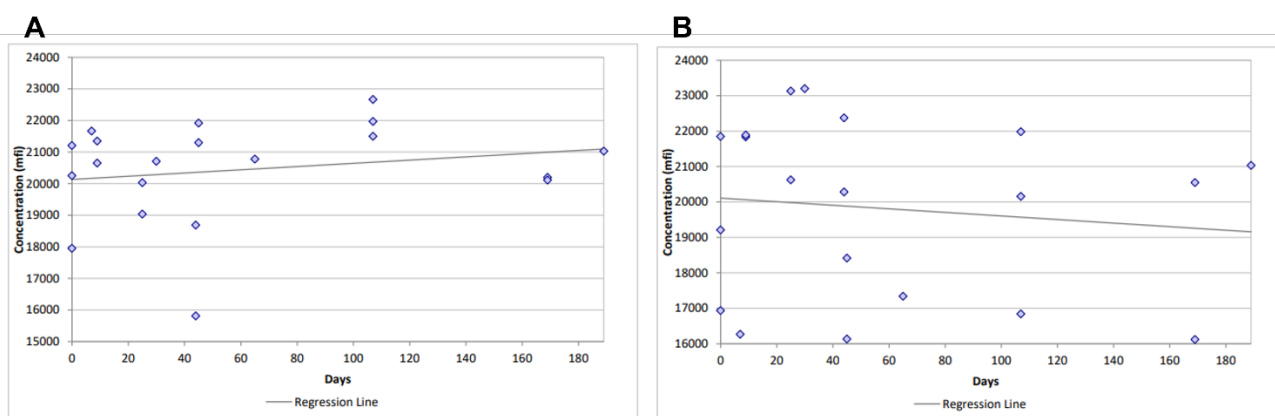
Todos os parâmetros apresentam estabilidade em condições normais de uso e simulação de expedição e envio por 189 dias.

A análise estatística apresentou $p > 0.05$ ao comparar os valores de MFI de todos os lotes produzidos e CV menor que 15% ao comparar os valores de MFI do dia 0 e do dia 189.

Os gráficos abaixo foram obtidos a partir da análise estatística de regressão linear e demonstram a estabilidade dos parâmetros. Todos os ensaios foram realizados na plataforma multiplex com os lotes produzidos, porém a análise estatística foi realizada por parâmetro individual.

Abaixo os gráficos da análise estatística do parâmetro de TOXO (Figura 18). Os dados apresentaram $p > 0.05$ ao comparar os valores de MFI de todos os ensaios realizados até o momento, indicando a estabilidade do parâmetro por 189 dias.

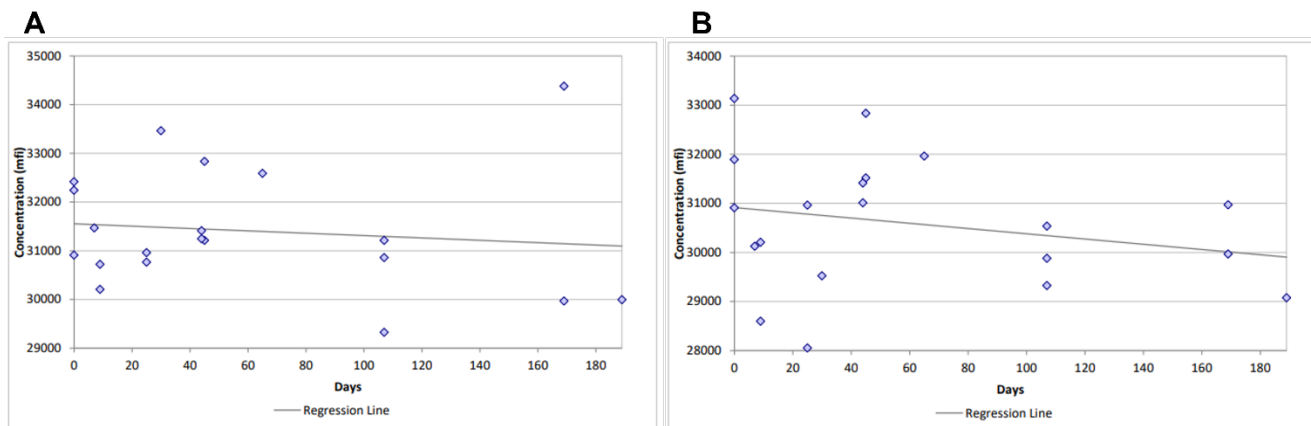
Figura 18: Estabilidade a longo prazo do parâmetro de TOXO. A) Análise estatística dos lotes em condição normal de uso, B) Análise estatística dos lotes em simulação de expedição e envio.



Fonte: Próprio autor.

A análise estatística de RUB apresentou $p > 0.05$ ao comparar os valores de MFI de todos os ensaios dos lotes em uso normal e simulação de expedição e envio, indicando a estabilidade do parâmetro por 189 dias. Os gráficos abaixo (Figura 19) demonstram a análise de regressão linear.

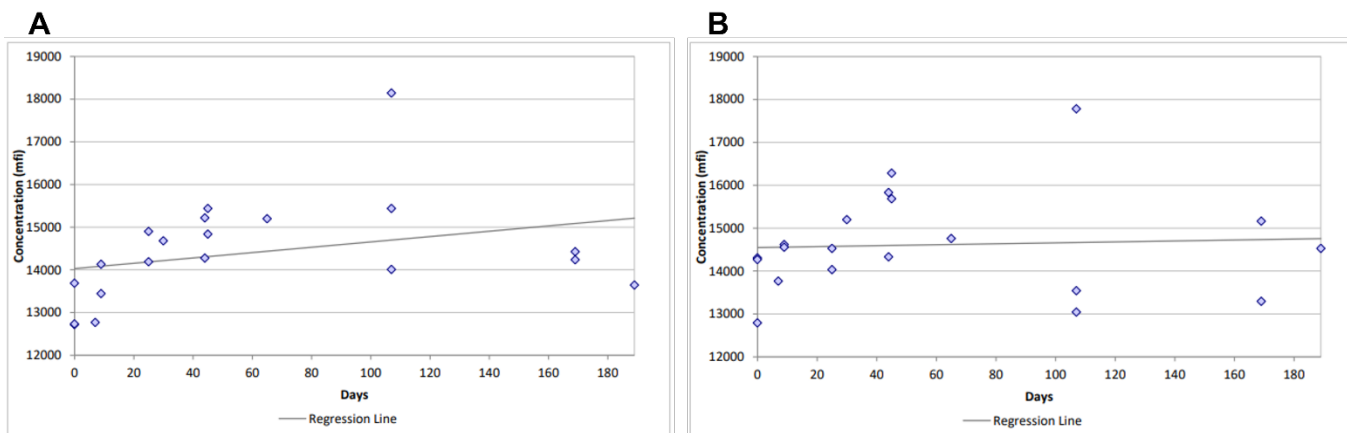
Figura 19: Estabilidade a longo prazo do parâmetro de RUB. A) Análise estatística dos lotes em condição normal de uso, B) Análise estatística dos lotes em simulação de expedição e envio.



Fonte: Próprio autor.

A análise estatística de CMV apresentou $p > 0.05$ ao comparar os valores de MFI de todos os ensaios dos lotes em uso normal e simulação de expedição e envio, indicando a estabilidade do parâmetro por 189 dias. Os gráficos abaixo (Figura 20) demonstram a análise de regressão linear.

Figura 20: Estabilidade a longo prazo do parâmetro de CMV. A) Análise estatística dos lotes em condição normal de uso, B) Análise estatística dos lotes em simulação de expedição e envio.



Fonte: Próprio autor.

6 DISCUSSÃO

Desde a sua introdução os programas de triagem neonatal no país e no mundo vêm implementando a utilização de novas tecnologias para detecção precoce de condições congênitas. Com os recentes avanços, as plataformas com capacidade de multiplexar vários ensaios moleculares e imunológicos para a triagem de alto rendimento foram desenvolvidos. Trata-se de uma moderna plataforma que tem como principais vantagens a economia de tempo e reagentes (SAHAI; MARSDEN, 2009).

Dentre as novas tecnologias, a plataforma multiplex de microesferas magnéticas da empresa Luminex Corporation permite o desenvolvimento de métodos de ensaios com até 100 analitos diferentes no mesmo poço da placa de ensaio (KHALIFIAN; RAIMONDI; BRANDACHER, 2015).

Para que a detecção dos alvos seja realizada, analitos devem ser acoplados a estas microesferas. Este acoplamento é realizado por interação química entre os grupos carboxilas nas superfícies das microesferas com as aminas primárias das proteínas. Estas ligações são covalentes e realizadas na maioria das vezes, com anticorpos ou antígenos específicos (DUNBAR, 2006; MAZHARI *et al.*, 2020).

O primeiro passo para o desenvolvimento da metodologia proposta é a definição do antígeno a ser utilizado para cada parâmetro e a melhor concentração de acoplamento. Em nosso estudo inicialmente diversos antígenos recombinantes foram testados para TOXO, RUB e CMV. A utilização de antígenos recombinantes e peptídeos multiepítopos apresentam resultados promissores para o desenvolvimento de novas estratégias capazes de discriminar infecções recentes de infecções crônicas (ROSTAMI; KARANIS; FALLAHI, 2018).

Todos os antígenos utilizados no projeto foram testados inicialmente na concentração de 120 µg/mL, concentração inicial de acoplamento definido pelo laboratório a partir de experiências prévias. A partir do desempenho de cada um, novos acoplamentos foram realizados aumentando ou diminuindo a concentração, a fim de se obter maiores valores de MFI nas amostras positivas e menores nas negativas e no

branco. Além disso, cada antígeno foi testado individualmente nos tampões de acoplamento PBS e MES, sendo o pH 7.4 e 5, respectivamente.

O desempenho de cada antígeno pode variar de acordo com o pH do tampão de acoplamento utilizado, por isso pelo menos dois pH diferentes foram testados durante o desenvolvimento do nosso projeto. Isso ocorre devido a necessidade de condições corretas de pH e força iônica para que as aminas primárias das proteínas realizem ligações covalentes com os grupos amidas das microesferas carboxiladas ativadas (MCDONALD *et al.*, 2016). Todos os antígenos utilizados em nosso estudo apresentaram melhor desempenho utilizando PBS como tampão de acoplamento.

Com a ampliação das doenças triadas o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam a otimização e implementação das análises em todas as regiões, inclusive nas mais remotas do país é de extrema necessidade. Para a utilização desses novos métodos diagnósticos desenvolvidos no Brasil, o produto deve atender aos critérios de aceitação da ANVISA para validação de métodos analíticos.

A precisão de um procedimento analítico expressa a proximidade de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas de uma mesma amostra (MAYURI; RAVINDRANATH; DOLTADE, 2019). Em nosso estudo, os ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade realizados para análise da precisão apresentaram CV menor que 15% em todas as análises demonstrando concordância entre diferentes ensaios com uma mesma amostra.

O kit em desenvolvimento é considerado semiquantitativo. Essa definição ocorre porque o kit entrega os resultados em forma qualitativa, ou seja, positivo ou negativo. Entretanto, valores quantitativos ocasionalmente podem ser utilizados, principalmente em caso de re-coleta de um mesmo paciente.

Neste contexto os valores em MFI de um resultado, podem ser comparados com resultados de coleta posterior (de um mesmo indivíduo), para assim verificar se ocorreu aumento ou diminuição significativa na reatividade. Desta maneira é necessário demonstrar que a resposta em MFI do produto é proporcional a concentração de anticorpos das amostras.

A capacidade de se obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração do anticorpo alvo específico contra o analito de interesse na amostra é a linearidade do método (RAJAM *et al.*, 2019).

Em nosso estudo a linearidade foi verificada com uso de amostras que possuem dados sobre unidade de reatividade. Como estas amostras possuem valores em unidades, é possível verificar como ocorre a resposta em relação a dose, ou seja, relação MFI e AU/mL ou s/co. Os testes realizados indicam que todos os parâmetros testados são capazes de produzir resposta (em MFI) correspondente a dosagem de anticorpos IgM nas amostras de referência.

O efeito pró-zona de alta dose foi verificado com uso de amostras altamente reativas para os três antígenos. Foi possível observar no ensaio efeito de alta dose nas maiores concentrações com diminuição da reatividade, porém essa diminuição não ocorreu de forma significativa com CV menor que 15% ao comparar os valores de MFI. Além disso, embora ocorra inibição da ligação antígeno-anticorpo, a mesma está distante da diluição utilizada no estudo.

Diluições seriadas com amostras padrões de cada parâmetro variando de 1:10-1:1280 foram feitas e testados com o protocolo de ensaio. Todas as análises foram feitas isoladamente para avaliar a faixa de MFI gerada por cada conjunto individual de microesferas. Apesar dos diferentes perfis de cada curva de diluição, a diluição de 1:200 deu ótimos resultados de sinal para todos os antígenos (Figura 16). Essa diluição também permitiu um maior grau de discriminação entre amostras negativas e positivas, assim, foi usado em todos os experimentos subsequentes.

Todos os parâmetros apresentaram baixos valores de LMD, sendo 44, 65 e 47 MFI respectivamente para TOXO, RUB e CMV. O LMD corresponde a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sobre condições experimentais estabelecidas. Isso ocorre porque normalmente um ensaio não é capaz de medir as concentrações do analito até zero (TALEUZZAMAN; JOURNAL, 2018).

Especificidade analítica é a capacidade de avaliar inequivocamente o analito na presença de outros componentes que podem estar presentes nas amostras, como a matriz. O método em desenvolvimento deve ser capaz de produzir resposta apenas para o alvo específico (RAVISANKAR *et al.*, 2015).

No estudo o kit NeoMAP® 3plex IgM se mostrou específico em todos os parâmetros, com ausência de reatividade da matriz no ensaio realizado apenas com o concentrado de hemácias. Ou seja, o kit foi capaz de gerar sinais livres de interferência na plataforma multiplex.

A validação é fundamental para a operação eficiente de novos métodos analíticos e deve ser realizada em todas as etapas, desde as matérias primas utilizadas até o produto finalizado. A frase validação implica basicamente em uma atividade de demonstração de viabilidade e possui como objetivo demonstrar que o produto desenvolvido atende aos critérios de aceitação preconizados e é adequado aos objetivos propostos (MAYURI; RAVINDRANATH; DOLTADE, 2019; RAJAM *et al.*, 2019). No presente estudo o kit desenvolvido esteve de acordo com todos os critérios propostos para registro do produto no Brasil e sua utilização no território nacional.

7 CONCLUSÃO

Os dados demonstraram que para detecção de anticorpos IgM contra Toxoplasmose será utilizado o antígeno TG a 30 µg/mL. Para Rubéola o antígeno RUB-4 também a 30 µg/mL e Citomegalovírus o antígeno CM-6 a 120 µg/mL, todos com PBS como tampão de acoplamento. A análise ROC na plataforma multiplex obteve alta sensibilidade e especificidade em todos os parâmetros quando utilizados de forma simultânea. Os ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade apresentaram CV menor que 15% em todas as amostras, demonstrando confiabilidade nos dados obtidos em todos os ensaios. Os ensaios de alta dose demonstraram que em maiores concentrações ocorre tendência de inibição da ligação antígeno-anticorpo, sendo necessário utilizar a diluição definida de 1:200. Os lotes produzidos para estudo de estabilidade acelerada demonstram que ocorre perda da estabilidade a 37°C antes de três dias em um dos parâmetros e com isso o kit deve ser armazenado sobre refrigeração, enquanto o estudo de estabilidade a longo prazo apresenta estabilidade do kit a 189 dias sobre as condições estabelecidas. Os dados obtidos apresentaram resultados compatíveis com os requisitos da RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 da ANVISA para utilização do produto em desenvolvimento no território nacional, sendo o mesmo aprovado com número de registro.

REFERÊNCIAS

ANGELONI, S. *et al.* **The xMAP cookbook**. 5th. edn. Austin, TX: Luminex Corporation, 2022. Disponível em: <http://info.luminexcorp.com/download-the-xmap-cookbook>. Acesso em: 12 abr. 2022.

ATTIAS, M. *et al.* The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 588, 2020.

BERRY, S. A. Newborn Screening. **Clinics in Perinatology**, v. 42, n. 2, p. 441-453, 2015.

BOA-SORTE, Ney *et al.* Dried blood spot testing for the antenatal screening of HTLV, HIV, syphilis, toxoplasmosis and hepatitis B and C: prevalence, accuracy and operational aspects. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, p. 618-624, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 36, de 26 de agosto de 2015, dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico in vitro. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 166, de 24 de julho de 2017, dispõe sobre a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017.

CAMARGO NETO, Eurico *et al.* Newborn screening for congenital infectious diseases. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 6, p. 1069, 2004.

CHEN, L. *et al.* Seasonal influence on TORCH infection and analysis of multi-positive samples with indirect immunofluorescence assay. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 33, n. 4, 2019.

CHIOPRIS, G. *et al.* Congenital cytomegalovirus infection: Update on diagnosis and treatment. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, 2020.

DE CARVALHO, T. M. *et al.* Newborn screening: a national public health programme in Brazil. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 30, n. 4, p. 615, 2007.

DIOVERTI, M. V.; RAZONABLE, R. R. Cytomegalovirus. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 4, 2016.

DUNBAR, S. A. Applications of Luminex® xMAP™ technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. **Clinica Chimica Acta**, v. 363, n. 1-2, p. 71-82, 2006.

DUSZAK, R. S. Congenital rubella syndrome-major review. **Optometry**, v. 80, n. 1, p. 36-43, 2009.

EL BISSATI, K. *et al.* Global initiative for congenital toxoplasmosis: an observational and international comparative clinical analysis. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 2018.

GAN, S. D.; PATEL, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 9, p. 1–3, set. 2013.

GARCÍA-BERMEJO, I.; DE ORY-MANCHÓN, F. Serological diagnosis of congenital infections and algorithms to improve diagnostic efficacy. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. S2, p. 20–26, 2015.

KAUSHIK, A.; VERMA, S.; KUMAR, P. Congenital rubella syndrome: A brief review of public health perspectives. **Indian journal of public health**, v. 62, n. 1, p. 52-54, 2018.

KHALIFIAN, S.; RAIMONDI, G.; BRANDACHER, G. The Use of Luminex Assays to Measure Cytokines. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 4, p. 1, 20 abr. 2015.

KIEFFER, F.; WALLON, M. Congenital toxoplasmosis. *In: Handbook of Clinical Neurology*. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 112, p. 1099–1101.

KONSTANTINOOU, G. N. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *In: Methods in Molecular Biology*. [s.l.]: Humana Press Inc., 2017. v. 1592, p. 79–94.

LANDOLFO, S. *et al.* The human cytomegalovirus. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 98, n. 3, p. 269-297, 2003.

LEUNG, A. K. *et al.* Congenital cytomegalovirus infection. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 95, n. 3, 2003.

MAWSON, A. R.; CROFT, A. M. Rubella virus infection, the congenital rubella syndrome, and the link to autism. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 19, 2019.

MAYURI, D.; RAVINDRANATH, S.; DOLTAGE, M. Analytical Method Development and Validation: A Review. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 563–570, 2019.

MAZHARI, R. *et al.* A comparison of non-magnetic and magnetic beads for measuring IgG antibodies against Plasmodium vivax antigens in a multiplexed bead-based assay using Luminex technology (Bio-Plex 200 or MAGPIX). **PLoS ONE**, v. 15, n. 12, 2020.

MCAULEY, J. B. Congenital toxoplasmosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. Suppl1, 2014.

MCDONALD, J. U. *et al.* Development of a custom pentaplex sandwich immunoassay using Protein-G coupled beads for the Luminex® xMAP® platform. **Journal of Immunological Methods**, v. 433, p. 6–16, 1 jun. 2016.

MINUZZI, Ana Lucia M. **Análise comparativa entre testes de ELISA convencional (soro) e papel filtro (sangue seco), para detecção de Toxoplasmose IgM.** 2008. 60f. Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

NJUE, A. *et al.* The role of congenital cytomegalovirus infection in adverse birth outcomes: A review of the potential mechanisms. **Viruses**, v. 13, n. 1, 2021.

PETERSEN, E. *et al.* Congenital toxoplasmosis: Should we still care about screening? **Food and Waterborne Parasitology**, v. 27, 2022.

RAJAM, G. *et al.* Development and validation of a robust multiplex serological assay to quantify antibodies specific to pertussis antigens. **Biologicals**, v. 57, p. 9–20, 1 jan. 2019.

RAVISANKAR, P. *et al.* A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. **IOSR Journal Of Pharmacy**, v. 10, n. 7, p. 7-19, 2015.

ROSS, S. A.; NOVAK, Z.; BOPPANA, S. B. Overview of the Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. **Infectious Disorders-Drug Targets**, v. 11, n. 5, p. 466-474, 2011.

ROSTAMI, A.; KARANIS, P.; FALLAHI, S. Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. **Infection**, v. 46, n. 3, p. 303-315, 2018.

SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 805-814, 2012.

SAHAI, I.; MARSDEN, D. Newborn screening. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 46, n. 2, p. 55-82, 2009.

SHAH, Karishma; MAGHSOUDLOU, Panagiotis. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. **British journal of hospital medicine**, v. 77, n. 7, p. C98-C101, 2016.

SILASI, M. *et al.* Viral Infections During Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 73, n. 3, p. 199–213, 1 mar. 2015.

SMITH, N. C. *et al.* Control of human toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 2-3, p. 95-121, 2021.

STEPHEN, L. Multiplex immunoassay profiling. *In: Methods in Molecular Biology*. [s.l.] Humana Press Inc., 2017. v. 1546, p. 169–176.

TALEUZZAMAN, M.; JOURNAL, I. Organic & Medicinal Chem IJ Limit of Blank (LOB), Limit of Detection (LOD), and Limit of Quantification (LOQ) Organic and Medicinal Chemistry. **Organic & Medicinal Chem IJ**, v. 7, n. 5, 2018.

TAMIRAT, B.; HUSSEN, S.; SHIMELIS, T. Rubella virus infection and associated factors among pregnant women attending the antenatal care clinics of public hospitals in Hawassa City, Southern Ethiopia: A cross-sectional study. **BMJ Open**, v. 7, n. 10, 1 out. 2017.

THERRELL JUNIOR, B. L.; PADILHA, C. D. Newborn screening in the developing countries. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 30, n. 6, p. 734-739, 2018.

THERRELL, Bradford L. *et al.* Current status of newborn screening worldwide: 2015. *In: SEMINARS IN PERINATOLOGY*. WB Saunders, 2015. p. 171-187.

WILCKEN, B.; WILEY, V. Newborn screening. **Pathology**, v. 40, n. 2, p. 104–115, 2008.