



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0812771-9 B1



(22) Data do Depósito: 06/06/2008

(45) Data de Concessão: 22/01/2019

(54) Título: MÉTODO PARA A DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO IN VITRO DE UMA INFECÇÃO POR UM MICROORGANISMO

(51) Int.Cl.: G01N 33/543; G01N 33/576.

(30) Prioridade Unionista: 08/06/2007 FR 0755626; 11/06/2007 US 60/929,061.

(73) Titular(es): BIO-RAD INNOVATIONS.

(72) Inventor(es): CHRISTINE CHARPENTIER; STÉPHANE GADELLE; NADINE LAMBERT; AMPARO SANJUAN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008057111 de 06/06/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/148883 de 11/12/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/12/2009

(57) Resumo: MÉTODO PARA A DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO IN VITRO DE UMA INFECÇÃO POR UM MICROORGANISMO, CONJUNTO DE REAGENTES PARA A REALIZAÇÃO DO MÉTODO DE DETECÇÃO A invenção se refere a um método para a detecção e diagnóstico in vitro de uma infecção por um microorganismo, que compreende colocar uma amostra biológica, em um recipiente único de ensaio, na presença de partículas, cada uma carregando pelo menos um parâmetro físico específico detectável, dois grupos diferentes, um anticorpo de captura anti-IgM e pertencentes a pelo menos dos grupos carregando um e o outro grupo carregando um antígeno de captura derivado do dito microorganismo.

MÉTODO PARA A DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO *IN VITRO* DE UMA INFECÇÃO POR UM MICROORGANISMO

[0001] A invenção refere-se à detecção *in vitro* de uma infecção com um infectante, em particular, um microorganismo viral. A invenção se refere a um método para detectar simultaneamente imunoglobulinas totais e imunoglobulinas M direcionadas contra este mesmo microorganismo infeccioso. A invenção se refere mais especificamente para a detecção simultânea de imunoglobulinas totais e imunoglobulinas M direcionadas contra o vírus da hepatite humana.

[0002] Infecções causadas por microorganismos, em especial por vírus como, por exemplo, o vírus da hepatite em seres humanos, em geral, constituem um problema de saúde preocupante que tem sido reconhecido há muito tempo, em particular na transfusão sanguínea e no diagnóstico.

[0003] Em geral, a fim de evitar a propagação descontrolada de um agente infeccioso, em particular de um vírus de hepatite, é essencial determinar o quanto antes se uma amostra de um paciente ou de uma bolsa de sangue para transfusão está contaminada com tal agente ou vírus. Além disso, é muito importante ser capaz de monitorar o estado imunológico do paciente durante a infecção, a fim de determinar se o paciente terá entrado ou não em convalescença, e, assim, aplicar as medidas terapêuticas adequadas e/ou uma imunização, quando esta existir .

[0004] Os métodos para a detecção *in vitro* desse tipo de infecção são comumente baseados na detecção por imunoensaio (ou determinação quantitativa imunológica) dos anticorpos

dirigidos contra os agentes infecciosos. Imunoglobulinas M ("IgMs"), que aparecem cedo e transitoriamente, são a marca registrada de uma infecção aguda recente ou primária. Imunoglobulinas totais, que agrupam os vários isotipos de imunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) são a marca registrada da cronicidade ou duração da infecção ao longo do tempo, ou ainda da fase de convalescença do paciente. Em um tempo considerável após uma infecção aguda, as imunoglobulinas totais consistem predominantemente de anticorpos IgG para suportar a imunidade a longo prazo (Hollinger et al. *Fields Virology*, p. 735-785, 1996). Por esta razão, é importante ser capaz de diferenciar, durante uma infecção, entre IgMs e imunoglobulinas totais em um paciente. Esta é uma situação muito comum em sorologia *in vitro*.

[0005] Este tipo de problema é particularmente encontrado no caso de infecções causadas pelo vírus da hepatite em seres humanos: a infecção com o vírus da hepatite A, chamado VHA; infecção com o vírus da hepatite B, chamado VHB, etc. Uma situação semelhante é encontrada com outras viroses sanguíneas nos seres humanos: VHS (vírus Herpes simplex), CMV (citomegalovírus), vírus da dengue, outros flavivírus (como o Vírus do Nilo Ocidental), o vírus da rubéola, o vírus da influenza, VVZ (vírus Varicela Zoster), etc, com diversas bactérias (*Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*, etc.), e com diversos parasitas unicelulares (*Toxoplasma gondii*, por exemplo).

[0006] A detecção de imunoglobulinas totais pelo formato indireto (reação da amostra em uma fase sólida carregando o antígeno alvo, e então visualização com um

anticorpo marcado anti-imunoglobulina humana) é conhecida há muitos anos, nomeadamente, com as patentes pioneiras de ELISA nos anos 70. No entanto, este formato não é preferível, uma vez que está sujeito a interferências inespecíficas, *inter alia*, com fator reumatóide, potencialmente presente na amostra testada.

[0007] Além disso, Heinz F. X., *et al* em "Comparison of two different enzyme immunoassays for detection of tick-borne encephalitis virus in serum and cerebrospinal fluid" (*Journal of Clinical Microbiology*, 14: p. 141-146, (1981)), observaram a existência, em um ensaio EIA indireto (ensaio imunoenzimático) para detecção de IgM, de competição entre IgMs e IgGs, que afeta a sensibilidade e a especificidade da detecção final.

[0008] A detecção de imunoglobulinas totais pelo método "sanduíche de antígeno duplo" (formato de reação da amostra carregando imunoglobulinas a serem detectadas com uma fase sólida carregando o antígeno, em seguida, com a visualização de um segundo antígeno que é detectavelmente marcado) é conhecida desde 1978 (Maiolini, R. *et al.*; *Journal of Immunological Methods*, 20 (1978) p. 25-34 e também o pedido de patente francês publicado FR 2 383 446).

[0009] A detecção de imunoglobulinas de classe específica pelo método de "captura de imunoglobulina" é em si conhecida também há muitos anos. Foi descrita em 1979 por Duermeyer W. *et al.*, (*Journal of Medical Virology* 4 (1979): p. 25-32) para a detecção específica de IgMs anti-VHA por ELISA (ver também patente US 4.292.403). O princípio do teste baseia-se na utilização de microcavidades revestidas com anticorpos anti-

IgM humano, nas quais a amostra de sangue contendo as IgMs a serem detectados é adicionada. Após um período de incubação, os poços da microplaca são lavados e o antígeno VHA é adicionado em uma quantidade conhecida, e depois incubado. Finalmente, ainda após a lavagem, qualquer antígeno ligado é, então, detectado por meio de uma incubação final realizada na presença de um anticorpo (F(ab')₂) dirigido contra o antígeno VHA e marcado com uma enzima. A patente US 4.273.756 do mesmo modo descreve o método de "captura de imunoglobulina" de classe específica para a detecção de IgAs, IgDs, IgEs, IgGs e IgMs dirigidas contra vários vírus de hepatite (VHA, VHB).

[0010] Em geral, além do diagnóstico relacionado apenas ao VHA, tentativas têm sido feitas, é claro, por razões óbvias de custos e simplificação, para desenvolver um método para detectar simultaneamente as precoces IgMs e as IgGs tardias (o que geralmente constitui a maior parte das imunoglobulinas totais).

[0011] Conforme relatado por Olli Meurman ("Detection of antiviral IgM antibodies and its problems - A review", em *New Developments in Diagnostic Virology*, editora Peter A. Bachmann, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1983) e W. Duermeier ("A new principle for the detection of specific IgM antibodies applied in an ELISA for hepatitis A"), (*Journal of Medical Virology* 4 (1979): p. 25-32 - acima), as tentativas revelaram consumir muito tempo e muito trabalho. Isso acontece porque elas envolvem uma etapa preliminar de separar os vários tipos de imunoglobulinas, quer por ultracentrifugação zonal ou de gradiente de sacarose, ou por filtração em gel, ou por adsorção de IgGs com proteína estafilocal A ou com um

anticorpo anti-Fc gamma, ou então por clivagem de IgMs com com β -mercaptoetanol.

[0012] Outra alternativa é combinar duas diferentes visualizações. Angarano et al., (*Journal of Clinical Microbiology*, junho de 1984, p. 905-910) propõem um sistema para a detecção simultânea de anticorpos IgMs anti-HBc e Igs total (principalmente IgG), chamado RIELISA (Ensaio Imunosorvente Radio-Imune Ligado a Enzima), que combina um radioimunoensaio competitivo para detecção de imunoglobulinas anti-HBc totais (ensaio CORAB da Abbott Laboratories) com um imunoensaio de ELISA indireto para detecção de IgMs anti-HBc. Nos dois ensaios, o mesmo antígeno (antígeno HBc recombinado) é adsorvido em uma única fase sólida (pérola de isopor, colocada em um poço), mas, por um lado, um anticorpo dirigido contra o antígeno HBc e marcado radioativamente (iodo ¹²⁵) é usado para a detecção de imunoglobulinas anti-HBc totais e, por outro lado, um anticorpo anti-IgM marcado enzimaticamente (com peroxidase) é usado para a detecção de IgMs anti-HBc. Angarano et al. (*acima*) especifica que o único ponto essencial é que a marcação dos anticorpos antígeno-específicos deve ser diferente e não deve interferir com a do anticorpo específico da classe da imunoglobulina.

[0013] É óbvio que o sistema de Angarano et al., com seus dois sistemas de sinais distintos obrigatórios (ou seja, com dois rótulos detectáveis) está longe de ser simples: depois de um primeiro passo imunológico realizado simultaneamente para os dois ensaios, os sinais devem ser medidos separadamente e sequencialmente e de uma forma complexa. Na verdade, o processo começa com a medição do primeiro sinal radioativo,

ligado à fase sólida, refletindo assim os títulos de imunoglobulinas anti-HBc totais e, em seguida, em uma segunda etapa, o anticorpo anti-IgM marcado com peroxidase é adicionado à pérola, seguido, após incubação, pela adição do substrato (H_2O_2) + mistura de cromógeno (OPD). Após a incubação e desenvolvimento da cor, esta reação final é interrompida com ácido clorídrico e a densidade óptica final obtida, a qual reflete os títulos de IgM anti-HBc, é medida.

[0014] Além disso, como pode ser observado, o complexo sistema de Angarano *et al.*, que a seu crédito faz uma distinção clara entre os títulos de imunoglobulina anti-HBc total e os títulos de IgM anti-HBc, no entanto, supõe que precauções específicas devam ser tomadas devido aos riscos associados com a manipulação de compostos radioativos (*i.e.*.. iodo ^{125}). Finalmente, a metodologia de Angarano *et al.* ainda tem de recorrer à eliminação prévia da interferência de fator reumatóide (inerente ao sistema imunoenzimático indireto para detecção de IgM), adicionando imunoglobulina G com calor agregado na diluição tampão. Tudo isso faz a metodologia de Angarano *et al.* relativamente desvantajosa.

[0015] Convencionalmente, a detecção de IgMs e IgGs dirigidas contra o mesmo vírus é obtida sobretudo através da realização de dois testes imunológicos em fases distintas, de modo a evitar qualquer possível interferência entre os dois ensaios e obter sinais de IgG e IgM claramente diferenciados.

[0016] Uso, portanto, tem sido feito, no método de "captura de imunoglobulina" convencional, de duas fases sólidas distintas, por exemplo, dois poços da microplaca de acordo com Duermeier W. *et al.* (acima) ou duas tiras de nitrocelulose, de

acordo com a técnica de Venture Technologies Malaisie (*Médecines et maladies infectieuses* [Medicinas e doenças infecciosas], 33, 2003, p. 396-412). Um deles é revestido com anticorpos anti-IgM e o outro com anticorpos anti-IgG, e a amostra é adicionada para cada um dos ensaios. Estas técnicas exigem, portanto, dois testes distintos para serem realizados e são, portanto, relativamente desvantajosas.

[0017] Além disso, é possível utilizar vários tipos de técnicas para detecção de imunoglobulinas por imunoensaio: além do teste de ELISA e radioimunoensaio mencionados acima, existem técnicas de imunofluorescência, imunoluminescência, etc, em fase heterogênea ou homogênea, etc. Existem também técnicas baseadas na imunoaglutinação de partículas, o sinal do final das quais pode ser detectado visualmente ou quantificado utilizando um instrumento de detecção, *inter alia*, utilizando um instrumento para a detecção por citometria de fluxo. Uma das vantagens conhecidas de medida por citometria de fluxo é que ela constitui um rápido e sensível meio para a detecção de um analito.

[0018] A citometria de fluxo é baseada na passagem de uma suspensão de micropartículas, na forma de um fluxo, em frente a um raio de luz. Sensores electro-ópticos certificam-se que uma única partícula em um tempo passe na frente do raio de luz. O sinal causado pela perturbação do raio de luz quando a partícula passa é então detectado e registrado.

[0019] A patente US 6.872.578 B2 descreve, em particular, um sistema de imunoensaio multiplex (ou seja, um sistema de imunoensaio com detecção simultânea de várias substâncias em uma única amostra). Este sistema combina, em um imunoensaio

heterogêneo, o uso de citometria de fluxo e de vários grupos de partículas sólidas. Estas partículas são magnéticas e cada uma leva um parâmetro específico detectável (ou seja, uma característica física como, por exemplo, um tamanho, uma cor única ou então uma fluorescência específica). Cada grupo de micropartículas compreende um intervalo de valores para diferenciar as partículas em vários grupos não sobrepostos distinguíveis por métodos de detecção automática adequados para os parâmetros em questão.

[0020] Cada uma destas partículas transporta, ligado à superfície, um reagente de ensaio diferente de um grupo para o outro. Todas as partículas do mesmo grupo carregam o mesmo reagente. A característica magnética dessas partículas permite a separação das fases sólida e líquida a serem automatizadas durante a lavagem.

[0021] Patente US 6.872.578 B2 descreve, particularmente, um exemplo de detecção simultânea de anticorpos de diferentes classes de imunoglobulinas (IgG e IgM) dirigidas contra o antígeno do vírus da rubéola. Neste exemplo, os IgGs e IgMs são imunopurificados usando uma primeira partícula magnética sensibilizada com o antígeno específico para as IgGs e IgMs a serem detectadas. Após esta primeira incubação, as imunoglobulinas inespecíficas são eliminadas durante a lavagem. As imunoglobulinas específicas, que são capturadas pelo antígeno adsorvido à partícula, em seguida, são liberadas no sobrenadante por adição de ácido acético. Esse sobrenadante é então transferido para outro tubo e as IgGs e IgMs são analisadas por meio de um método de sanduíche usando fases sólidas e conjugados, constituídos por anticorpos IgM anti-

humanos e IgG anti-humanos. Esta técnica é trabalhosa, uma vez que requer pré-tratamento da amostra, de modo a conservar apenas o antígeno-específico Igs.

[0022] Também é possível utilizar, como é o caso do sistema de "ensaio MULTIMETRIX *Borrelia* IgG ou IgM" da empresa MULTIMETRIX GmbH, (Heidelberg, Alemanha), uma mistura de partículas, cada uma revestida com um antígeno diferente de *Borrelia* recombinado, e detecção diferencial das IgMs e IgGs pelo método indireto usando anticorpos anti-IgG e anticorpos IgM marcados com um marcador fluorescente (ficoeritrina). A fluorescência do complexo final de cada pérola é medida por citometria de fluxo utilizando um analisador da empresa Luminex Corporation. Nenhuma etapa de lavagem é necessária, tornando assim um imunoensaio simplificado. No entanto, o protocolo requer vários tubos de reação e vários reagentes vendidos sob diferentes kits de referência. Este sistema é apresentado, de acordo com o folheto comercial obtido, como sendo sensível e confiável. O princípio para a detecção de anticorpos anti-EBV IgG e IgM em Bioplex 2200®, descrito na publicação por Klutts *et al.* (*Journal of Clinical Microbiology*, novembro de 2004, p. 4996-5000), é idêntico. Como acima, ele exige dois reagentes diferentes e as imunoreações são realizadas em dois tubos de reação diferentes. Estes dois ensaios EBV usam uma mistura de partículas, cada uma revestida com um antígeno EBV diferente, e a detecção diferencial das IgMs e IgGs pelo método indireto usando anticorpos anti-IgG e anti-IgM marcados com um marcador fluorescente (ficoeritrina), utilizando dois kits diferentes. A fluorescência do complexo final de cada partícula é medida

por citometria de fluxo usando um detector da empresa Luminex Corporation.

[0023] Existe, portanto, uma necessidade real de ter um método que é simples de realizar, rápido, sensível, específico, quantitativo ou semi-quantitativo e reproduzível e que pode ser automatizado - com vista à seleção durante todo o período da infecção e também em pré e pós-imunização - para a detecção e diferenciação de IgMs e imunoglobulinas totais (Igs totais), totalmente em simultâneo, ou seja, utilizando uma única amostra não pré-tratada, em um único recipiente de ensaio, no mesmo número de incubações, usando um único sistema de sinal e, em um primeiro e único tempo de leitura de sinal.

Resumo da invenção:

[0024] Os autores da presente invenção tem, por isso, procurado resolver o problema mencionado acima e, para isso, desenvolveram um método alternativo para detectar simultaneamente IgMs e imunoglobulinas totais dirigidas contra um e o mesmo antígeno em um único recipiente, e utilizando apenas uma amostra biológica, de preferência não pré-tratada.

[0025] O assunto da presente invenção é, assim, um método para a detecção e diagnóstico *in vitro* de uma infecção com um microorganismo, incluindo a detecção simultânea das imunoglobulinas G ou das imunoglobulinas totais e das imunoglobulinas M dirigidas contra microorganismos, presentes em uma amostra biológica, a qual o método compreende as seguintes etapas:

a) Colocar a dita amostra biológica, em um único recipiente de ensaio, na presença de partículas, cada uma carregando pelo

menos um parâmetro físico específico detectável, e pertencentes a pelo menos dois grupos diferentes, um dos grupos carregando um anticorpo de captura de anti-IgM e o outro grupo carregando um antígeno de captura derivado do dito microorganismo,

b) incubar a mistura em condições que permitem a formação de imunocomplexos em cada grupo de partículas,

c) eliminar as imunoglobulinas, que não tenham ligação com as partículas,

d) incubar a mistura da etapa b) com pelo menos um conjugado marcado, o dito pelo menos um conjugado composto exclusivamente de um antígeno de detecção derivado do dito microorganismo,

e) eliminar o antígeno de detecção não ligado para os imunocomplexos da etapa b),

f) detectar simultaneamente, por meio de um detector capaz de diferenciar os dois grupos de partículas acima mencionados, os imunocomplexos da etapa d) em cada partícula, em que a presença ou ausência de imunoglobulinas G ou imunoglobulinas totais e/ou imunoglobulinas M dirigidas contra o dito microorganismo é revelada.

[0026] De acordo com uma modalidade específica, os grupos das ditas partículas diferem um do outro em virtude de fluorocromos, detectáveis por um detector adequado.

[0027] Vantajosamente, o detector adequado é associado com um citômetro de fluxo.

[0028] A marcação do antígeno de detecção pode ser direta ou indireta. Por exemplo, o antígeno de detecção pode carregar um

biotina, que é revelada pela adição de avidina ou estreptavidina.

[0029] Preferencialmente, o microorganismo é um vírus humano, em especial o vírus da hepatite humana.

[0030] A matéria da invenção é também um kit de diagnóstico ou um conjunto de reagentes para a realização do método de detecção, incluindo as partículas em especial, cada uma com pelo menos um parâmetro físico específico detectável, e pertencentes a pelo menos dois grupos diferentes, um dos grupos carregando um anticorpo de captura anti-IgM e outro grupo com um antígeno de captura derivado de um microorganismo a ser detectado.

Descrição detalhada da invenção:

[0031] No intuito de resolver o problema indicado, os inventores, antes de tudo realizaram um ensaio multiplex para detecção simultânea, em um recipiente único, de IgG anti-VHA e IgM em uma amostra (soro ou plasma), combinando dois métodos por imunocaptura (Veja os detalhes do protocolo e resultados na **Seção experimental**, Exemplo 1 comparativo, e os métodos de ensaio na Figura 1):

- O primeiro com partículas superparamagnéticas carregando anticorpos IgG anti-humanos,
- O segundo com partículas superparamagnéticas carregando anticorpos anti-IgM humanos.

[0032] Após a incubação (captura das IgGs e IgMs da amostra e formação dos primeiros imunocomplexos) e uma primeira lavagem, o antígeno VHA foi adicionado. Após uma segunda

incubação, o antígeno VHA (Ag VHA) estava vinculado aos dois tipos de complexos formados.

[0033] Após uma segunda lavagem, as duas reações foram reveladas pela adição de um anticorpo monoclonal (Mab) anti-VHA, acoplado a um fluorocromo (ficoeritrina, simbolizada como PE). Após a incubação do conjugado e uma terceira lavagem, o sinal foi lido por citometria de fluxo em cada partícula. Os resultados de IgG e IgM foram obtidos separadamente por meio da leitura dos sinais pelos dois laser adequados do citômetro de fluxo.

[0034] A detecção de IgM atingiu uma sensibilidade aceitável, mesmo em baixas concentrações, o que representa uma situação bastante comum após uma infecção pelo VHA.

[0035] A sensibilidade da detecção de IgG foi, por outro lado, claramente insuficiente, nessa configuração, devido à grande abundância natural de IgGs (todas as especificidades antigênicas incluídas) na amostra. Na verdade, as partículas superparamagnéticas anti-IgG eram muito rapidamente saturadas com as IgGs não específicas para o VHA, presentes na amostra, e não mais capturava bastante IgG anti-VHA, especialmente em baixas concentrações de anticorpos IgG anti-VHA. Isto resultou em uma sensibilidade analítica insuficiente.

[0036] Este é precisamente o caso na detecção de imunoglobulinas anti-VHA total para os quais existe um limiar de sensibilidade clínica essencial para a detecção de anticorpos anti-VHA no contexto de proteção pós-vacinação. Este limiar de proteção tem sido fixado por consenso, a 20 mUI / ml, em relação a um padrão OMS - anti-VHA (97/646). Abaixo deste valor, o indivíduo não está protegido; acima deste

valor, o título de IgG é suficiente para garantir que o indivíduo esteja protegido contra o vírus.

[0037] Os inventores, pois, propuseram outros métodos de ensaio, a fim de resolver o problema da falta de "sensibilidade de IgG" descrito no ensaio anterior.

[0038] Surpreendentemente, os inventores mostraram que o multiplex combinando os dois métodos descritos a seguir para o Exemplo 2 (veja os detalhes do protocolo e os resultados na **Seção experimental**, Exemplo 2, e os métodos de ensaio na Figura 2) é capaz de detectar simultaneamente, em um recipiente único, as concentrações baixas de IgG sem dessensibilizar a detecção de IgM, e, ainda, faz com que seja possível diferenciar, de uma forma completamente sensível e específica, entre os anticorpos IgM anti-VHA e as imunoglobulinas totais.

[0039] Assim, esse método para detectar simultaneamente, em um único recipiente, a IgG anti-VHA e IgM em uma amostra (soro ou plasma) [na qual o método é, portanto, o método de acordo com a presente invenção] combina dois métodos de ensaio (um método de ensaio de "captura de imunoglobulina" de acordo com Duermeier W. *et al.*, para IgMs e um método de ensaio de "duplo sanduíche de antígeno" de acordo com Maiolini R., *et al.*, para a IgGs):

- O primeiro com partículas superparamagnéticas carregando anticorpos IgM anti-humanos,
- O segundo com partículas superparamagnéticas carregando antígeno de captura de VHA.

[0040] Após a incubação (captura das IgGs e IgMs da amostra e formação dos primeiros imunocomplexos) e uma primeira

lavagem, um antígeno VHA biotinilado é adicionado. Após uma segunda incubação, o antígeno VHA está vinculado a esses dois tipos de complexos formados.

[0041] Após uma segunda lavagem, as duas reações são reveladas pela adição de estreptavidina acoplada a um fluorocromo (ficoeritrina). Após a incubação e lavagem, o sinal é lido por citometria de fluxo em cada partícula. Os resultados de IgG e IgM são obtidos separadamente através da leitura dos sinais pelos dois lasers adequados do citômetro de fluxo.

[0042] A invenção, que resulta em uma detecção sensível e diferencial de IgMs anti-VHA e Igs totais, é inteiramente surpreendente: isso porque não havia um alto risco, com a combinação, em um recipiente único, dos dois formatos de acordo com o método da invenção, que não haveria competição para as IgMs anti-VHA da amostra, entre o antígeno VHA imobilizado e o anticorpo anti-IgM imobilizado. Em outras palavras, devido a aplicação simultânea dos dois formatos descritos acima, em um único e mesmo recipiente, havia um risco de que algumas das IgMs anti-VHA da amostra fossem capturadas (representadas pela seta tracejada na Figura 2) pelas partículas superparamagnéticas carregando o antígeno VHA, utilizado justamente para capturar as IgGs, e já não seriam detectadas como IgM. Essa competição iria, inevitavelmente, resultar em detecção completamente insuficiente da resposta de IgM (falta de sensibilidade) e, portanto, sendo impossível detectar as IgMs cedo. Estes técnicos na arte teriam percebido inteiramente o tamanho desse

risco e, portanto, teriam sido claramente dissuadidos de adotar esta combinação (multiplex), de acordo com a invenção.

[0043] Os inventores têm igualmente utilizado o método multiplex de acordo com a invenção para detectar simultaneamente IgG e anticorpos IgM dirigidos contra o capsídeo do vírus da hepatite B (detecção de núcleo HB de IgG e anticorpos IgM). Para esse efeito, consulte a **Seção experimental**, Exemplo 3, e os formatos de ensaio na Figura 3.

[0044] Nesta base, os inventores propõem um método para a detecção geral de IgGs e IgMs, em formato multiplex, que pode ser adaptado para muitos microorganismos para os quais é importante, do ponto de vista de diagnóstico, para detectar IgG e IgMs.

[0045] Na seção a seguir, um certo número de definições úteis para a compreensão da invenção é fornecido.

Definições

[0046] No contexto da invenção, uma "**amostra biológica**" de preferência, consiste de um fluido biológico, como sangue, plasma, soro, urina, líquido, saliva, etc. Preferencialmente, a amostra é plasma ou soro. A amostra é preferencialmente de origem humana, mas também pode provir de um animal para os quais a detecção de uma infecção microbiológica é necessária.

[0047] O termo "detecção multiplex" refere-se, no âmbito da presente invenção, à detecção simultânea de pelo menos dois tipos de anticorpos dirigidos contra o mesmo ou vários microorganismo(s) infeccioso, e escolhido do grupo consistindo de imunoglobulinas M, G , A, D e E e imunoglobulinas totais no sangue.

[0048] O termo "anticorpos" refere-se a qualquer anticorpo total ou fragmento funcional de um anticorpo que compreende ou consiste de pelo menos um sítio de combinação antigênica que permite aos ditos anticorpos vincular a pelo menos um determinante antigênico de um composto antigênico. A título de exemplo de fragmentos de anticorpos, poderão citar-se Fab, Fab' e fragmentos de $F(ab')_2$ e também cadeias de scFv (fragmento variável de cadeia única), cadeias de dsFv (fragmento variável duplo-ramificado), etc. Esses fragmentos funcionais podem, em particular, ser obtidos por engenharia genética.

[0049] O termo "**fragmento antigênico**" ou "**antígeno**" destina-se ao todo ou parte de uma proteína natural ou recombinada de um microorganismo infeccioso, como o vírus da hepatite A, capaz de induzir a síntese de anticorpos em um paciente infectado ou em um animal imunizado.

[0050] Em particular, a expressão "**antígeno derivado do microorganismo**", se é para captura ou detecção, destina-se a qualquer antígeno selecionado do grupo consistindo de um lisado do dito microorganismo, um de seus antígenos naturais que tenham sido semi-purificados ou purificados, uma proteína recombinante, um fragmento deste e um peptídeo sintético.

[0051] O termo "**antígeno de captura**" destina-se a um fragmento antigênico ligado a uma fase sólida, que é capaz de ser reconhecido por anticorpos dirigidos contra o microorganismo, como os anticorpos anti-VHA, e de permitir a afinidade de ligação com o último.

[0052] O termo "**anticorpos de captura**" destina-se a um anticorpo ou uma parte de um anticorpo ligado a uma fase

sólida, que é capaz de manter pelo menos um determinante antigênico de um composto antigênico presente em uma amostra biológica, por afinidade de ligação.

[0053] Os anticorpos de captura anti-IgM e os antígenos de captura podem ser associados às partículas por qualquer técnica adequada. Podem ser ligados por covalescência direta, ou não covalentemente, em especial por afinidade. A ligação direta covalente pode ser realizada por meio da ativação dos grupos carboxílicos presentes nas partículas, envolvendo a ligação via hidroxisuccinimida ou carbodiimida por exemplo.

[0054] O termo "**antígeno de detecção**" destina-se a um antígeno marcado que torna possível tanto detectar anticorpos IgM pelo método de imunocaptura, ou detectar anticorpos IgG pelo método de sanduíche antígeno-anticorpo-antígeno convencional, também chamado de método "sanduíche antígeno duplo" (Maiolini et al. (1978)). A detecção do antígeno pode ser igual ou diferente do antígeno de captura.

[0055] O termo "**marcado**" refere-se tanto para marcação direta (por meio de fluorocromos, compostos luminescentes, etc) e à marcação indireta (por exemplo, por meio de anticorpos ou antígenos, se diretamente marcados, ou usando reagentes de um "par de afins" marcados, tais como, mas não exclusivamente, o par marcado avidina-biotina, etc.).

[0056] A produção de anticorpos monoclonais ou anticorpos policlonais que podem ser utilizados no contexto da invenção é o resultado de técnicas convencionais.

[0057] **Os anticorpos monoclonais** podem ser obtidos de acordo com o método convencional de fusão de linfócito e cultura de hibridomas descrito por Köhler e Milstein (*Nature*, 256, p.

495-497 (1975)). Outros métodos de preparação de anticorpos monoclonais são também conhecidos (Harlow et al. Editores, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Os anticorpos monoclonais podem ser preparados pela imunização de um mamífero (por exemplo, um rato, um camundongo, um coelho, ou mesmo um ser humano, etc) e usando a técnica de fusão de linfócitos, que produz hibridomas (Köhler e Milstein, 1975, *acima*).

[0058] Técnicas alternativas para esta técnica habitual existe. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos pela expressão de um ácido nucléico clonado a partir de um hibridoma. Anticorpos também podem ser produzidos pela técnica de exposição de fago, introduzindo cDNAs de anticorpos em vetores, que são tipicamente fagos filamentosos (por exemplo, Fuse5 para *E. coli*, Scott et al. (*Science*, 249, pp. 386-390 (1990))). Estes últimos constituem as bibliotecas e exibem os fragmentos scFv na sua superfície. Protocolos para a construção destas bibliotecas de anticorpos são descritos em Marks et al. (1991) (*J. Mol. Biol.*, 222, pp. 581-597, (1991)).

[0059] Os **anticorpos policlonais** podem ser obtidos no soro de um animal imunizado contra um antígeno de peptídeo natural, de acordo com os protocolos habituais.

[0060] Em geral, um polipeptídeo, em particular um peptídeo recombinado, ou um oligopeptídeo, pode ser usado, por exemplo, como imunogênio. De acordo com um protocolo convencional, os coelhos são imunizados com o equivalente a 1 mg do peptídeo imunogênio de acordo com o procedimento descrito por Benoit et al. [*PNAS E.U.A.*, 79, pp. 917-921 (1982)].

[0061] Aos animais são dadas injeções de 200 µg de antígeno, em intervalos de quatro semanas, e são sangrados 10 a 14 dias depois. Após a terceira injeção, a capacidade do anti-soro para se ligar ao peptídeo antigênico radiomarcado com iodo, preparado pelo método de cloramina-T, é avaliada. É então purificado por cromatografia em coluna de troca iônica composto de carboximetilcelulose (CMC). As moléculas de anticorpos recolhidas por eluição são então ajustadas para a concentração desejada por métodos bem conhecidos para os técnicos na arte, por exemplo, utilizando Sephadex DEAE a fim de obter a fração de IgG.

[0062] O termo "**partículas**" destina-se a todas as partículas, de preferência de forma aproximadamente esférica (elas são, então, geralmente chamadas de pérolas), com tamanhos que podem ser entre 0,3 µm e 100 µm de diâmetro, e de preferência, entre 0,5 µm e 40 µm. Essas partículas são fabricadas, por exemplo, pelas empresas Luminex, Merck ou Dynal.

[0063] As partículas preferencialmente consistem de polímeros que são inertes em relação aos componentes das amostras biológicas ; elas são sólidas e insolúveis nas amostras. Os polímeros utilizados podem ser poliésteres, poliéteres, poliolefinas, poliamidas, polissacarídeos, poliuretanos ou celulose. Ligantes também podem ser utilizados a fim de dar integridade e estrutura para as partículas.

[0064] Os grupos funcionais podem ser incorporados com esses polímeros, a fim de permitir a ligação ou acoplamento de macromoléculas de interesse biológico (proteínas, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos). Estes grupos funcionais,

conhecidos por aqueles especializados na arte, podem ser de função amina ($-NH_2$) ou função amônia ($-NH^3+$ ou $-NR^3+$), função de álcool ($-OH$), função carboxílica ($-COOH$) ou função isocianato ($-NCO$). Os monômeros mais utilizados para a introdução de funções de $COOH$ em poliolefinas são ácido acrílico ou ácido metacrílico.

[0065] A ligação de reagentes na superfície das partículas pode ser realizada por atrações eletrostáticas, interações de afinidade, interações hidrofóbicas ou ligação covalente. Ligação covalente é preferida.

[0066] As partículas usadas aqui podem ser distinguidas em que elas carregam parâmetros físicos específicos detectáveis, ou seja, marcadores diferenciais para distingui-las entre si por citometria de fluxo. Preferencialmente, pelo menos dois tipos de rótulos diferentes ou parâmetros são utilizados. Por exemplo, as partículas podem ser impregnadas com um ou mais corantes (por exemplo fluorescente, luminescente, etc), se for o caso em várias concentrações, ou com um rótulo de radioisótopo, enzimático, etc, tipo (Venkatasubbarao S. "Microarrays - Status and prospects" *Trends in Biotechnology* dezembro 2004, 22 (12) : 630-637; Morgan et al, "Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology", *Clin. Immunol.* (2004) 100: 252-266). Alternativamente, as partículas de diversos tamanhos podem ser utilizadas.

[0067] Em uma modalidade preferida, as partículas distinguíveis emitem sinais luminescentes ou fluorescentes. Grânulos fluorescentes superparamagnéticos de Luminex podem, por exemplo, ser usados.

[0068] Essas propriedades físico-químicas também podem tornar possível, durante a reação com a amostra biológica, separar as frações capturadas por estas micropartículas daquelas que não estão vinculadas. Esta separação pode ser efetuada, *inter alia*, por centrifugação, filtração ou magnetização. Separação por magnetização é a preferida e, por isso, os grânulos contendo componentes paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos e metamagnéticos podem ser utilizados. Componentes paramagnéticos são preferidos, por exemplo, ferro, cobalto, níquel ou óxidos metálicos como Mn_2O_3 , Cr_2O ou Fe_3O_4 . A quantidade de componentes magnéticos pode ser entre 2% e 50% (em peso), e de preferência entre 3% e 25%.

[0069] Em uma modalidade preferida, a presente invenção usa um método de imunoensaio que combina citometria de fluxo com o uso de partículas, de preferência superparamagnéticas, suporte como fase sólida (utilizando, em um mesmo recipiente, várias categorias ou grupos de partículas distintas).

[0070] Cada grupo de partículas é específico para uma imunorreação e pode ser diferenciado de outras partículas pelas propriedades físico-químicas (tamanho, distribuição granulométrica, fluorescência e/ou densidade ótica). A propriedade das partículas superparamagnéticas facilita a separação entre as fases sólida e líquida nas etapas de lavagem e permite que os ensaios sejam automatizados. No entanto, não é obrigatório que os grãos usados sejam superparamagnéticos. Como grânulos superparamagnéticos que podem ser utilizados, podem citar em particular, as descritas na patente US 6.872.578. A fase final de detecção de acordo com o método da invenção geralmente inclui:

- i) a leitura simultaneamente, por meio de um detector capaz de diferenciar os sinais dos dois grupos de partículas acima mencionadas, os imunocomplexos marcados da etapa c) em cada partícula,
- ii) a obtenção dos resultados em separado para cada grupo de partículas, e
- iii) interpretar os resultados como uma indicação da presença ou ausência de imunoglobulinas totais (Igs total) e/ou de imunoglobulinas M dirigidas contra o dito microorganismo.

[0071] As partículas são preferencialmente submetidas a uma avaliação por citometria de fluxo, como descrita, por exemplo, no pedido de patente da Luminex WO97/14028. Assim, os subgrupos de partículas carregando um reagente (anticorpo ou antígeno) estão expostos a uma amostra biológica, cada subgrupo tendo um ou mais parâmetros de classificação que permitam distinguir as partículas de um subgrupo com relação a outro subgrupo. As partículas, portanto, expostas à amostra, em seguida, passam para uma zona de exame (ou seja, um citômetro), onde os dados relativos aos parâmetros de classificação (por exemplo, as intensidades de emissão de fluorescência), e preferencialmente também os dados relativos à presença ou ausência de um complexo formado entre o reagente e o analito de interesse, são coletados.

[0072] Assim, por exemplo, no caso em que as partículas emitem sinais fluorescentes, após a adição da amostra a ser analisada e de conjugados específicos (marcados, por exemplo, com um marcador fluorescente), o sinal de fluorescência emitido pelos imunocomplexos formados em cada partícula é

medido usando um citômetro de fluxo de partículas com um leitor laser (por exemplo, do aparelho tipo Luminex TM).

[0073] A fluorescência específica para cada partícula é gravada separadamente, mas simultaneamente para todas as partículas. Um sinal totalmente separado e distinto é finalmente obtido para cada grupo de partículas.

[0074] A presente invenção, portanto, torna possível a obtenção, por meio de um protocolo simples e automatizado, duas medições separadas e sensíveis, uma para as IgMs, outra para as imunoglobulinas totais, dirigidas contra o mesmo microorganismo infeccioso.

[0075] A presente invenção é descrita abaixo, mais particularmente, com vista à detecção simultânea de IgMs e IgGs (ou Igs totais) para o vírus da hepatite A e para o vírus da hepatite B, e para a detecção simultânea de IgMs e IgGs ou (Igs totais) para *Treponema pallidum*, o agente bacteriano infeccioso responsável pela sífilis.

[0076] No entanto, é evidente que a presente invenção aplica-se amplamente a todos os vírus (HSV, vírus da dengue, outros flavivírus, como o vírus do Nilo Ocidental, a rubéola e o vírus da gripe, VZV, CMV, etc), para todas as bactérias (*Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*, etc) e/ou a todos os parasitas (*Toxoplasma gondii*, etc) em que há semelhança e existe a necessidade de detectar simultaneamente IgMs e IgGs (ou imunoglobulinas totais), no mesmo recipiente de ensaio, sem qualquer perda de sensibilidade.

[0077] No método de acordo com a invenção, a amostra não precisa se submeter a um tratamento prévio, como uma reação enzimática, digestão ou modificação, ou como uma reação

química ou modificação, ou coisa parecida, etc (por exemplo, ultracentrifugação zonal ou de gradiente de sacarose, filtração em gel, adsorção de IgG através da proteína estafilococal A ou através de anticorpo Fc anti-gama ou clivagem das IgMs com β -mercaptoetanol. No entanto, é possível realizar o método de acordo com a invenção de uma amostra que tenha sido submetida a um pré-tratamento.

[0078] O recipiente pode ser qualquer recipiente sólido, por exemplo, um tubo de ensaio, uma microplaca ou um cuvete de reação em polipropileno.

[0079] A eliminação dos reagentes desacoplados pode ser realizada por qualquer técnica conhecida para aqueles qualificados na arte, como a lavagem por meio de etapas repetidas de centrifugação ou tirando vantagem da natureza superparamagnética das pérolas, usando ímãs.

[0080] Em uma modalidade específica do método de acordo com a invenção, o microorganismo é escolhido do grupo que consiste de vírus humanos, bactérias e parasitas, de preferência um parasita de uma única célula. Em uma modalidade preferida do método de acordo com a invenção, o microorganismo é escolhido do grupo que consiste de vírus humanos. Em uma modalidade particularmente preferida do método de acordo com a invenção, o microorganismo é escolhido do grupo que consiste de vírus da hepatite humana, tais como os vírus VHA e VHB.

[0081] Em uma modalidade preferida, o dito microorganismo é o vírus da hepatite A humana (VHA), para o qual é então possível obter um limite de detecção inferior de imunoglobulinas anti-VHA totais de aproximadamente 20 mIU / ml.

[0082] Uma matéria da presente invenção é também um conjunto de reagentes para a realização do método de acordo com a invenção.

[0083] Uma matéria da presente invenção é também um kit de reagentes para a realização do método de acordo com a invenção.

[0084] O tipo de detecção simultânea e combinada de IgMs dirigidas contra um microorganismo infeccioso e de anticorpos IgG ou Igs totais contra este mesmo microorganismo infeccioso é, no contexto da presente invenção, chamado de "detecção multiplex" em oposição a uma "detecção simplex" (onde as detecções de IgM e IgG ou Ig total são realizadas de forma independente, ou seja, não são combinadas).

[0085] A presente invenção também é dirigida e engloba todas as variantes de um método de detecção simultânea, as quais as variantes podem ser obtidas através de métodos que são conhecidos por si ou podem ser deduzidos pelos técnicos na arte, sem se afastar do escopo da presente invenção.

[0086] A presente invenção agora será explicada em maior detalhe com os seguintes exemplos.

[0087] As seguintes figuras e exemplos ilustram a invenção, sem limitar o seu escopo.

Legendas das figuras

[0088] Figura 1 é um esquema que mostra a detecção de anticorpos IgGs anti-VHA e IgMs pelo formato de imunocaptura dupla (estado da técnica).

[0089] Figura 2 é um esquema mostrando o método da invenção para a detecção de anti-HVA total Igs em formato de sanduíche e anti-VHA IgMs por imunocaptura.

[0090] Figura 3 é um esquema mostrando o método da invenção para a detecção de Igs anti-HBc totais em formato de sanduíche e IgMs anti-HBc por imunocaptura.

[0091] Figura 4 é um gráfico que mostra uma comparação entre os intervalos padrão para as Igs anti-VHA totais analisadas pelo formato da unidade IgG (imunocaptura) e pelo formato sanduíche da unidade de Ig total.

[0092] Figura 5 é um gráfico que mostra uma comparação entre os intervalos padrão para Igs anti-VHA totais analisadas pelo formato sanduíche de unidade e pelo multiplex.

[0093] Figura 6 é um esquema mostrando o método da invenção para a detecção de Igs totais anti-*Treponema pallidum* em formato sanduíche e IgMs anti- *Treponema pallidum* por imunocaptura.

Seção Experimental

Exemplo 1: Método de acordo com a tecnologia anterior

[0094] O princípio do ensaio de acordo com a técnica anterior é ilustrado na **Figura 1**.

Materiais e métodos:

Materiais:

1. Sistema de análise:

[0095] O analisador BioPlex 2200® (Bio-Rad, Marnes La Coquette, França) foi utilizado conforme as instruções do fabricante. Este dispositivo automático imunoanalítico contém

um citômetro de fluxo e um detector Luminex 100™ (Luminex Corp, Austin, Texas, Estados Unidos) e usa conjuntos heterogêneos de partículas superparamagnéticas. Cada grupo de partículas, composto de poliestireno e de ácido metacrílico (função COOH), e tendo um tamanho de 8 µm de diâmetro, é fabricado com diferentes percentagens de fluorocromos (CL1 e CL2), produzindo um código de identificação único atribuído a cada grupo de partículas e detectáveis pelo laser do detector Luminex 100™ (Luminex Corp, Austin, Texas, Estados Unidos). Após a imunorreação, as pérolas passam uma por uma célula de fluxo, no centro de uma matriz de líquidos, de modo a serem simultaneamente excitadas e lidas por dois lasers distintos. As medições são realizadas em cada esfera que passa.

[0096] O laser vermelho 638 nm excita os fluorocromos identificados (CL1 e CL2) incorporados na superfície de cada partícula e o sinal composto é interpretado de modo a identificar a substância da partícula. Ao identificar a categoria de partícula, este laser, portanto, serve para identificar a análise em curso.

[0097] O laser verde de 532 nm excita a sonda fluorescente (conjugado marcado com ficoeritrina (PE)) e a fluorescência emitida é proporcional ao conjugado ligado à partícula. Este laser, portanto, serve para medir a reação do analito imobilizado na dita partícula.

[0098] O software do sistema converte o sinal do conjugado em um valor de intensidade de fluorescência relativa (RFI). Os sinais são então comparados com uma curva padrão específica para o ensaio, a fim de determinar a concentração do analito.

A relação também pode ser calculada para classificar qualitativamente o resultado como positivo ou negativo.

2. Fase sólida:

[0099] Dois grupos distintos de partículas superparamagnéticas Luminex™ (Luminex Corp, Austin, Texas, Estados Unidos) foram utilizados.

[0100] Cada grupo de partículas é revestido com um ligante específico para um determinado ensaio. Cada ligante é acoplado com um reagente heterobifuncional.

- Grupo 1: anticorpo monoclonal de camundongo com IgM anti-humana (Hytest, Finlândia), imobilizado em 10 mg / mg de partículas.

- Grupo 2: anticorpo monoclonal de camundongo com IgG anti-humana (Fc gama; Jackson Immuno Research, Estados Unidos) imobilizado a 20 mg / mg de partículas.

3. Antígeno VHA:

[0101] Antígeno VHA de Antígeno Viral, Memphis, Tennessee, Estados Unidos.

4. Fluorocromo:

[0102] Ficoeritrina da Cyanotech, Havaí, Estados Unidos.

5. Conjugado:

[0103] Anticorpo monoclonal de camundongo anti-VHA (Bio-Rad, Marnes La Coquette, França), acoplado a ficoeritrina (PE), utilizando um reagente heterobifuncional, conhecido por si mesmo para os técnicos na arte.

6. Diluentes:

6.1. Diluentes de partículas superparamagnéticas:

[0104] Solução de 20 mM de citrato tampão, pH 5,6, contendo: 116 mM de NaCl, 5,6 mM de EDTA, 2% de Triton, 10% de soro de

ovelhas, 0,5 g / l de IgG de camundongo, 0,5% de Proclín 300™ (marca da empresa Supelco), 25% de leite de vaca (100% desnatado), 0,13% de IgG BS3.

6.2. Diluentes para o antígeno VHA e para o conjugado:

[0105] Solução de 50 mM de tampão fosfato, pH 7,1, contendo: 150 mM de NaCl, 0,1% de NaN₃, 1% de BSA, 2,75% de PEG 6000, 0,1% de Tween 20™ (marca da empresa Sigma), 1% de soro de ovelhas, 1 g / l de IgG de camundongo.

6.3. Diluentes para a etapa 1, ou solução de lavagem:

[0106] Tampão fosfato, pH 7,4, contendo: 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20™ (marca da empresa Sigma), 0,034% de Proclín 300™ (marca da empresa Supelco), 0,095% de NaN₃.

7. Cuvetes da reação:

[0107] As imunoreações foram realizadas em uma célula de reação de polipropileno com um volume de 1 ml.

8. Padrões:

[0108] O padrão de imunoglobulina anti-VHA total da OMS (código 97/646) foi reconstituído de acordo com as recomendações e diluído de modo a dar os seguintes pontos padrão: 0, 20, 80, 160, 320 e 640 mUI / ml.

Métodos:

Protocolo de Ensaio:

Etapa 1:

1. Seguem-se, sucessivamente, distribuídos em cada célula de reação:

5 µl de amostra ou do padrão + 250 µl de diluentes para a etapa 1,

10 µl de partículas imunorreativas (mistura de 50:50 de partículas dos grupos 1 e 2) + 250 µl de diluentes para a etapa 1.

2. Após a homogeneização, a mistura é incubada por 40 minutos a 37°C.

3. As etapas de lavagem são então realizadas: a separação das fases sólida e líquida por magnetização e três lavagens sucessivas com pelo menos 300 µl de solução de lavagem. Na última lavagem, as partículas são re-suspensas.

Etapa 2:

[0109] **4.** 50 µl de solução de antígeno VHA (Ag VHA) são distribuídos em cada célula de reação.

[0110] **5.** Após homogeneização, a mistura é incubada por 15 minutos a 37 ° C.

[0111] **6.** As etapas de lavagem são então realizadas (idem ponto 3).

Etapa 3:

7. 50 µl do conjugado (anticorpo anti-VHA-ficoeritrina, ou seja, Mab-PE) são distribuídos em cada célula de reação.

8. Após homogeneização, a mistura é incubada por 15 minutos a 37°C.

9. As etapas de lavagem são então realizadas (idem ponto 3).

10. As partículas de cada poço são re-suspensas, adicionando-lhes 35 µl da solução de lavagem com agitação.

11. A suspensão de partículas de cada poço é retirada pelo citômetro de fluxo.

12. A suspensão de partículas de cada célula é lida usando os dois raios laser.

13. Os resultados das leituras são diretamente processados pelo citômetro de fluxo e registados como unidades de intensidade de fluorescência relativa (unidades de RFI).

14. Para interpretar os resultados, para cada ponto padrão (ou amostra), uma proporção é calculada em relação a um valor de corte. Em termos de Igs anti-VHA totais, o valor-limite corresponde ao valor de RFI do ponto padrão a **20 mUI / ml** considerado o valor de corte de proteção.

[0112] A proporção das amostras é calculada da seguinte forma:

$$\text{Quociente de amostra} = \frac{\text{média* do sinal de RFI da amostra}}{\text{Valor de corte}}$$

[0113] As amostras cujos índices são maiores que 1 são declaradas positivas, para as quais as relações que são menos de 1 são declaradas negativas.

[0114] * Todos os ensaios de amostras humanas são realizados em duplicado (em duas repetições) e os resultados de RFI utilizados provêm da média das duas repetições.

Resultados dos ensaios realizados no intervalo padrão

[0115] Detecção das IgMs por imunocaptura não emitiu qualquer problema.

[0116] Atenção em particular tinha sido dada ao formato de imunocaptura de anti-VHA IgG, a fim de alcançar uma **sensibilidade analítica de 20 mUI / ml.**

[0117] No entanto, nos ensaios realizados, o formato de imunocaptura para a detecção de IgG anti-VHA mostra uma evidente falta de sensibilidade (ver Tabela 1 e Gráfico 1).

[0118] Isso ocorre porque os quocientes calculados para os padrões entre 0 e 80 mUI / ml não são significativamente diferentes um do outro e são muito próximos do padrão 20 mUI / ml (razão = 1,0) a ser confiavelmente selecionado. As proporções só começam a aumentar e, portanto, serem um reflexo de detecção de Ig total, para os padrões entre 160 e 640 mUI / ml.

Tabela 1: Avaliação do intervalo padrão de Ig anti-HVA

	Dosagem de IgG por imunocaptura de IgG	
Padrão (mUI / ml)	RFI	Proporção
0	19	0,79
10	22	0,92
20	24	1,00
40	29	1,21
80	41	1,71
160	60	2,50
320	89	3,71
640	133	5,54

[0119] Esta falta de sensibilidade é devido ao fato de que a fase sólida (partículas de IgG anti-humanas) não faz com que seja possível capturar especificamente as IgGs dirigidas contra o analito. A fase sólida é, portanto, saturada por todas as outras IgGs no soro.

[0120] Esse fenômeno não é visto no formato de imunocaptura para as IgMs porque é raro ter simultaneamente várias

infecções e ter, no soro, IgMs dirigidas contra diversos agentes infecciosos durante uma infecção aguda.

[0121] Este formato de imunocaptura foi, portanto, conservado para detecção de IgM, mas abandonado para detecção de IgG e substituído por um formato de sanduíche. Os resultados obtidos para o último formato serão descritos abaixo.

Exemplo 2: Método de detecção da invenção, aplicado à detecção de Igs anti-VHA totais e IgMs

[0122] O método de detecção multiplex de acordo com a invenção é descrito abaixo e na **Figura 2**.

Materiais e métodos:

Materiais:

[0123] O material é essencialmente idêntico ao utilizado no exemplo 1, para além das exceções a seguir indicadas.

1. O sistema de análise: ver descrição do exemplo 1.

2. Fase sólida:

[0124] Dois grupos distintos de partículas superparamagnéticas Luminex™ (Luminex Corp, Austin, Texas, Estados Unidos) são utilizados:

- Grupo 1: anticorpo monoclonal de camundongo IgM anti-humano (Hytest, Finlândia), imobilizado em 10 mg / mg de partículas;
- Grupo 2: antígeno VHA (Ag viral, Memphis, Tennessee, Estados Unidos) imobilizado em 2,5 mg / mg de partículas.

3. Conjugado 1:

[0125] Antígeno VHA (Ag viral, Memphis, Tennessee, E.U.A.) marcado com biotina (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos).

4. Conjugado 2:

[0126] Estreptavidina (abreviado para "Strepta", Roche Mannheim, Alemanha), acoplado a ficoeritrina (abreviado para "PE") da Cyanotech, Havaí, Estados Unidos.

5. Diluentes:

[0127] Os diluentes para as pérolas e para os conjugados 1 e 2, o diluente para a etapa 1 e a solução de lavagem são idênticos aos do exemplo 1.

6. Padrões:

[0128] O padrão OMS de imunoglobulina anti-VHA total (código 97/646) é idêntico ao utilizado no exemplo 1.

7. Exemplos:

[0129] As amostras humanas analisadas são amostras de plasma ou de soro que são positivas ou negativas para imunoglobulinas anti-VHA totais e/ou IgMs. Estas amostras são provenientes de bibliotecas de amostra interna, feitas de bolsas de amostras e das amostras vendidas pelas seguintes empresas:

ABO Farmacêutica - 7930 Arjons Drive, Suite A, San Diego, CA 92126, Estados Unidos,

Teragenix - 5440 NW 33 Avenue, Suite 108, Ft.. Lauderdale, FL 33309, Estados Unidos,

PromedDx - 10 Commerce Way, Norton, MA 02766, Estados Unidos,

Zeptometrix Corporation - 872 Main St., Buffalo, NY 14202, Estados Unidos,

BBI Diagnostoc - 375 West Street, West Bridgewater, MA 02379, Estados Unidos,

Life Sera - 780 Park North Blvd, Suite 100, Clarkston, GA 30021, Estados Unidos.

[0130] As amostras humanas analisadas podem ser divididas em:

- **30 amostras** negativas para imunoglobulinas anti-VHA totais e IgM (duplo negativas).
- **26 amostras** positivas para imunoglobulinas anti-VHA totais e negativas para IgM anti-VHA.
- **15 amostras** positivas para IgM anti-VHA e negativas para imunoglobulinas anti-VHA totais.

Métodos:

Protocolos de Ensaio:

[0131] Nos ensaios descritos a seguir, três protocolos de ensaio são implementados: o protocolo multiplex de acordo com a invenção (ou seja, o protocolo de Ig total + o protocolo de IgM) e duas unidades de protocolos (um protocolo de Ig total e um protocolo de IgM). Estes três protocolos são idênticos, exceto para a etapa de adição de partículas superparamagnéticas imunorreativas que são utilizadas. O protocolo multiplex utiliza os dois grupos de pérolas e cada unidade de protocolo utiliza um único grupo de pérolas. A quantidade de partículas do grupo 1 (carregando anticorpos anti-IgM) utilizada no protocolo da unidade IgM e no protocolo multiplex permanece a mesma. Da mesma forma, a quantidade de partículas do grupo 2 (carregando antígeno VHA) utilizada no protocolo da unidade de Ig total e do protocolo de multiplex permanece a mesma.

A. Protocolo de unidade para a detecção de Igs anti-HVA totais**Etapa 1:**

1. Seguem-se, sucessivamente, distribuídos em cada célula de reação:

25 µl de amostra ou do padrão + 225 µl de diluentes para a etapa 1,

10 µl de partículas imunorreativas do grupo 2 (antígeno VHA) + 250 µl de diluentes para a etapa 1.

2. Após a homogeneização, a mistura é incubada por 40 minutos a 37°C.

3. As etapas de lavagem são então realizadas: idem ponto 3 do exemplo 1.

Etapa 2:

4. 50 µl de solução de conjugado 1 (antígeno VHA biotinilado, ou seja, "Ag VHA biotina") são distribuídos em cada célula da reação.

5. Após homogeneização, a mistura é incubada por 15 minutos a 37 ° C.

6. As etapas de lavagem são então realizadas: idem ponto 3.

Etapa 3:

7. 50 µl do conjugado 2 (estreptavidina-ficoeritrina, ou seja "Strepta-PE") são distribuídos em cada célula da reação.

8. Após homogeneização, a mistura é incubada por 15 minutos a 37 ° C.

9. As etapas de lavagem são então realizadas: idem ponto 3.

10. As partículas de cada célula da reação são re-suspensas, adicionando-lhes 35 µl da solução de lavagem com agitação.

11. A suspensão de partículas de cada célula da reação é retirada pelo citômetro de fluxo.

12. A suspensão de partículas de cada célula é lida usando os dois raios laser.

13. Os resultados das leituras são diretamente processados pelo citômetro de fluxo e registrados em Unidades de Intensidade de Fluorescência Relativa (unidades de RFI).

14. Para interpretar os resultados, para cada ponto padrão ou amostra, uma proporção é calculada em relação a um valor de corte. Em termos de Igs anti-VHA totais, o valor-limite corresponde ao valor de RFI do ponto padrão de **20 mUI / ml** considerado o valor de corte de proteção.

[0132] A proporção das amostras é calculada da seguinte forma:

$$\text{Quociente de amostra} = \frac{\text{*média do sinal de RFI da amostra}}{\text{Valor de corte}}$$

[0133] As amostras cujos índices são maiores que 1 são declaradas positivas, para as quais as relações que são menos de 1 são declaradas negativas.

[0134] * Todos os ensaios de amostras humanas são realizados em duplicado (em duas repetições) e os resultados de RFI utilizados provêm da média das duas repetições.

B. Protocolo de unidade para a detecção de Ig Ms anti-VHA

Etapa 1:

1. Seguem-se, sucessivamente, distribuídos em cada célula de reação:

25 µl de amostra ou do padrão + 225 µl de diluente para a etapa 1,

10 µl de partículas imunorreativas do grupo 1 (anticorpos anti-IgM) + 250 µl de diluentes para a etapa 1.

Todas as outras etapas **(2-13)** do protocolo de unidade de IgM são rigorosamente idênticas às etapas 2-13 do protocolo de unidade de Ig total.

14. Para o cálculo das proporções da amostra, em termos de IgM VHA, o valor de corte é a média dos IRFs das amostras negativas + 12 desvios-padrões.

[0135] A proporção da amostra calculada é, pois, a seguinte:

$$\text{Quociente de amostra} = \frac{\text{*média do sinal de RFI da amostra}}{\text{valor de corte}}$$

[0136] As amostras cujos índices são maiores que 1 são declaradas positivas, para as quais as relações que são menos de 1 são declaradas negativas.

[0137] * Todos os ensaios de amostras humanas são realizados em duplicado (em duas repetições) e os resultados de RFI utilizados provêm da média das duas repetições.

C. Protocolo multiplex de acordo com a invenção (detecção simultânea de Igs anti-VHA totais e IgMs):

Etapas 1:

1. A seguir, são distribuídos com sucesso em cada célula de reação:

25 µl de amostra ou do padrão + 225 µl de diluente para a etapa 1,

10 µl de partículas imunorreativas (mistura de 50:50 de partículas dos grupos 1 e 2) + 250 µl de diluentes para a etapa 1.

[0138] Todas as outras etapas **(2-14)** do protocolo multiplex são rigorosamente idênticas às etapas 2-14 dos protocolos de unidade de Ig total e IgM.

Resultados obtidos:**1. Intervalos de calibração:****1.1. Intervalo padrão de Ig anti-VHA total analisado pelo sanduíche de unidade:**

[0139] Os resultados obtidos com a escala padrão (0-640 mUI / ml), realizada pelo sanduíche de unidade mostram que o formato de sanduíche de Ig total é muito mais sensível do que o formato de imunocaptura de IgG, por exemplo, 1 (ver tabela 2 e Figura 4).

Tabela 2: Comparação de intervalo padrão de Ig anti-VHA total analisado pelo formato de imunocaptura de unidade de IgG (exemplo 1) e pelo formato de sanduíche de unidade de Ig total (exemplo 2)

	Formato de imunocaptura de unidade de IgG (exemplo 1)		Formato de sanduíche de unidade de Ig total (exemplo 2)	
Padrão (mUI / ml)	RFI	Proporção	RFI	Proporção
0	19	0,79	53	0,32
10	22	0,92	115	0,70
20	24	1,00	165	1,00
40	29	1,21	307	1,86
80	41	1,71	604	3,66
160	60	2,50	820	4,97
320	89	3,71	1403	8,50
640	133	5,54	2994	18,15

1.2. Intervalo padrão de Ig anti-VHA total analisado por multiplex

[0140] Os resultados obtidos com a escala padrão realizada por sanduíche de acordo com o protocolo de multiplex de acordo com a invenção são relatados na Tabela 3 e Figura 5.

Tabela 3: Comparação do intervalo padrão de Ig total pelo formato de sanduíche de unidade e pelo multiplex

Padrão (mUI / ml)	Formato de sanduíche de unidade de Ig total		Formato de sanduíche multiplex de Ig total	
	RFI	Proporção	RFI	Proporção
0	53	0,32	53	0,35
10	115	0,70	112	0,75
20	165	1,00	150	1,00
40	307	1,86	260	1,73
80	604	3,66	449	2,99
160	820	4,97	852	5,68
320	1403	8,50	1372	9,15
640	2994	18,15	2353	15,69

[0141] Note-se que a sensibilidade do formato de sanduíche multiplex de Ig total permanece inalterada em relação à sensibilidade obtida pelo formato de sanduíche de unidade.

2. Amostras:

2.1. Ensaio das amostras para Igs anti-HVA total por sanduíche de unidade e por sanduíche multiplex:

[0142] Os resultados obtidos com as amostras de humanos para Igs anti-HVA total são relatados na tabela 4.

Tabela 4: Comparação das dosagens de amostras para Igs anti-HVA total pelo formato de sanduíche de unidade e por multiplex de acordo com a invenção

		Formato de sanduíche de unidade de Ig total		Formato de sanduíche de multiplex de Ig total	
		RFI	Proporção	RFI	Proporção
Valor de corte RFI padrão a 20 mUI / ml		165	1,00	150	1,00
Amostras negativas para IgG VHA, IgM VHA Média (n = 30)		39	0,24	46	0,30
Amostras positivas para IgG VHA e negativas para IgM VHA (n = 26)	1	1767	10,71	2208	14,72
	2	2576	15,61	4106	27,37
	3	1793	10,87	1382	9,21
	4	2172	13,16	3829	25,53
	5	1732	10,50	2763	18,42
	6	2229	13,51	3344	22,29
	7	2051	12,43	3245	21,63

8	2755	16,70	4612	30,75
9	1755	10,63	2503	16,69
10	3479	21,08	4898	32,65
11	2601	15,76	3429	22,86
12	2338	14,17	4014	26,76
13	3008	18,23	4362	29,08
14	3296	19,98	4034	26,89
15	2447	14,83	2468	16,45
16	1676	10,16	1809	12,06
17	714	4,32	622	4,15
18	2325	14,09	4392	29,28
19	1385	8,39	1300	8,67
20	2871	17,40	3668	24,45
21	2565	15,55	3011	20,07
22	2315	14,03	2611	17,41
23	2998	18,17	3555	23,70
24	1904	11,54	3259	21,73
25	2250	13,64	4644	30,96
26	1853	11,23	3190	21,27

[0143] Distinção muito boa é observada entre as amostras negativas (n = 30) e as amostras positivas (n = 26) no ensaio sanduíche de Ig anti-VHA total, independentemente se é

realizado pelo formato de unidade ou por multiplex de acordo com a invenção .

[0144] Estes resultados, portanto, mostram que a detecção de Igs anti-HVA total não é dessensibilizada no método multiplex de acordo com a invenção.

[0145] Todas as amostras positivas são de fato resultados positivos pelo método de acordo com a invenção, que assim torna possível também obter boa sensibilidade clínica.

2.2. Ensaio de amostras para IgM anti-VHA por unidade e formato de imunocaptura multiplex:

[0146] Os resultados obtidos com as amostras de humanos para IgM anti-VHA são apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Comparação do ensaio de amostras para IgM anti-VHA pelo formato de imunocaptura de unidade e formato de imunocaptura multiplex de acordo com a invenção

	Formato de imunocaptura de unidade de IgM		Formato de imunocaptura de Multiplex de IgM	
	RFI	Proporção	RFI	Proporção
Valor de corte negativo média + 12 SD	655	1,00	653	1,00
Amostras negativas para IgG VHA, IgM VHA Média (n = 30)	76	0,12	75	0,12
Amostras positivas para IgG VHA e negativas para IgM VHA Média (n = 26)	72	0,17	89	0,14
Amostras positivas	1 9978	15,23	8605	13,18

para IgM VHA e negativas para IgG VHA (n = 15)	2	12090	18,46	12389	18,97
	3	17619	26,90	16789	25,71
	4	13037	19,90	14024	21,48
	5	8923	13,62	8658	13,26
	6	20325	31,03	17150	26,26
	7	15444	23,58	13629	20,87
	8	15047	22,97	13561	20,77
	9	20611	31,47	19929	30,52
	10	15374	23,47	14068	21,54
	11	16774	25,61	20497	31,39
	12	19430	29,66	18986	29,08
	13	9501	14,51	13334	20,42
	14	16785	25,63	16113	24,68
	15	12647	19,31	16708	25,59

[0147] Distinção muito boa é observada entre as amostras negativas para IgM anti-VHA (n = 30 + 26) e as amostras

positivas para IgM anti-VHA (n = 15) no ensaio de IgM anti-VHA por imunocaptura, independentemente de ser realizado pelo formato de unidade ou por multiplex de acordo com a invenção.

[0148] Estes resultados demonstram que a detecção de IgMs por imunocaptura não é dessensibilizada pela combinação com o ensaio sanduíche no método multiplex de acordo com a invenção.

[0149] Todas as amostras positivas são realmente consideradas positivas pelo método de acordo com a invenção, que assim torna possível também obter boa sensibilidade clínica.

Exemplo 3: Método de detecção da invenção, aplicado à detecção de Igs anti-HBc totais e IgMs

[0150] O método de detecção multiplex de acordo com a invenção foi também utilizado para a dosagem de Igs anti-HBc totais e IgMs. Este método é ilustrado na **Figura 3** e descrito a seguir.

Materiais e métodos:

Materiais:

[0151] O material utilizado é equivalente ao do exemplo 2, com exceção das partículas, do conjugado biotinilado 1 e das amostras testadas.

1. Fase sólida:

[0152] Dois grupos distintos de partículas superparamagnéticas Luminex™ (Luminex Corp, Austin, Texas, Estados Unidos) são utilizados.

- Grupo 1: anticorpo policlonal IgM anti-humano de cabra (Bio-Rad, Marnes La Coquette) imobilizado em 10 µg / mg de partículas;

- Grupo 2: antígeno HB recombinado (Virogen, Watertown, MA, Estados Unidos) imobilizado em 10 µg / mg de partículas.

2. Conjugado 1:

[0153] Antígeno HBc recombinado (Biokit, Barcelona, Espanha), marcado com biotina (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos).

3. Amostras:

[0154] As amostras humanas analisadas são amostras de plasma ou de soro que são positivas ou negativas para as imunoglobulinas anti-HBc totais e/ou IgM anti-HBc. Essas amostras são provenientes de bibliotecas de amostras internas, a partir de amostras vendidas pelas empresas:

ABO Farmacêutica - 7930 Arjons Drive, Suite A, San Diego, CA 92126, Estados Unidos,

PromedDx - 10 Commerce Way, Norton, MA 02766, Estados Unidos,

Zeptometrix Corporation - 872 Main St., Buffalo, NY 14202, Estados Unidos.

[0155] As amostras humanas analisadas podem ser divididas em:

- **10 amostras** negativas para imunoglobulinas anti-HBc totais e IgM anti-HBc (duplo negativas).

- **10 amostras** positivas para imunoglobulinas anti-HBc totais e negativas para IgM anti-HBc.

- **10 amostras** positivas para IgM anti-HBc e negativas para imunoglobulinas anti-HBc totais.

Métodos:**Protocolos de Ensaio:**

[0156] Os protocolos utilizados são idênticos aos protocolos A, B e C acima descritos no exemplo 2, com exceção do volume da amostra utilizada na etapa 1, que é de 5 µl + 250 µl de solvente para a etapa 1.

[0157] As outras etapas são idênticas, incluindo a etapa de interpretação. Para o ensaio de Igs anti-HBc total e IgMs anti-HBc, o valor de corte é a média dos IRFs das amostras negativas + 12 desvios-padrão.

[0158] A proporção da amostra calculada em relação ao valor de corte é, portanto, o seguinte:

$$\text{Quociente de amostra} = \frac{\text{média* do sinal RFI da amostra}}{\text{valor de corte}}$$

[0159] As amostras cujos índices são maiores que 1 são declaradas positivas, para as quais as relações que são menos de 1 são declaradas negativas.

[0160] * Todos os ensaios de amostras humanas são realizados em duplicado (em duas repetições) e os resultados RFI utilizados provêm da média das duas repetições.

Resultados obtidos:**Tabela 6: Comparação das dosagens de amostras para Igs anti-HBc total pelo formato sanduíche de unidade e por multiplex de acordo com a invenção**

		Formato de sanduíche de unidade de Ig total		Formato de sanduíche Multiplex de Ig total	
		RFI	Proporção	RFI	Proporção
Valor de corte média dos negativos + 12 SD		202	1,00	231	1,00
Amostras negativas para Igs HBc total e IgM HBc Média (n = 10)		52	0,25	54	0,26
Amostras positivas para Igs HBc total e negativas para IgM HBc (n = 20)	1	1035	5,12	1027	4,44
	2	2151	10,63	2225	9,61
	3	1161	5,74	1334	5,76
	4	1577	7,79	1596	6,90
	5	2345	11,59	2134	9,22
	6	3499	17,29	3238	13,99
	7	1672	8,26	1316	5,69
	8	492	2,43	375	1,62
	9	3892	19,24	2435	10,52
	10	1565	7,74	1228	5,31
	11	682	3,37	1042	4,50
	12	1198	5,92	1705	7,37
	13	630	3,11	1408	6,08
	14	1188	5,87	2291	9,90

	15	2318	11,46	3311	14,31
	16	2402	11,87	3550	15,34
	17	3887	19,21	3888	16,80
	18	2020	9,98	2414	10,43
	19	1039	5,13	1720	7,43
	20	1334	6,59	1700	7,34

[0161] Distinção muito boa é observada entre as amostras negativas (n = 10) e as amostras positivas (n = 20), no ensaio de sanduíche de Ig anti-HBc total, independentemente se é realizado por formato de unidade ou pelo multiplex de acordo com a invenção .

[0162] Estes resultados demonstram que a detecção de Igs anti-HBc total não é dessensibilizada no método multiplex de acordo com a invenção.

[0163] Todas as amostras positivas são realmente consideradas positivas pelo método de acordo com a invenção, que assim torna possível também obter boa sensibilidade clínica.

Tabela 7: Comparação das dosagens de amostras para IgM anti-HBc por formato de imunocaptura de unidade e pelo formato multiplex de imunocaptura de acordo com a invenção

		Formato de imunocaptura de unidade de IgM		Formato de imunocaptura multiplex de IgM	
		RFI	Proporção	RFI	Proporção
Valor de corte negativo média + 12 SD		321	1,00	431	1,00
Amostras negativas para Igs HBc total e IgM HBc Média (n = 10)		99	0,35	112	0,32
Amostras positivas para Igs HBc total e negativas para IgM HBc Média (n = 10)		135	0,42	155	0,36
Amostras positivas para IgM HBc e negativas para Ig HBc total (n = 10)	1	3852	12,01	3239	7,52
	2	3687	11,50	3275	7,60
	3	2273	7,09	1549	3,60
	4	1697	5,29	1501	3,49
	5	2333	7,27	1570	3,64
	6	1302	4,06	1058	2,46
	7	5462	17,03	5813	13,50
	8	2595	8,09	3110	7,22
	9	1515	4,72	1857	4,31
	10	1128	3,52	1132	2,63

[0164] Distinção muito boa é observada entre as amostras negativas para IgM anti-HBc (n = 10 + 10) e as amostras positivas para IgM anti-HBc (n = 10) no ensaio de imunocaptura de IgM anti-HBc, independentemente se é realizado pelo formato de unidade ou por multiplex de acordo com a invenção.

[0165] Estes resultados demonstram que a detecção de IgMs por imunocaptura não é desensibilizada pela combinação com o ensaio sanduíche no método multiplex de acordo com a invenção.

[0166] Todas as amostras positivas são realmente consideradas positivas pelo método de acordo com a invenção, que assim torna possível também obter boa sensibilidade clínica.

Exemplo 4: Método de detecção da invenção, aplicado à detecção de Igs anti-sífilis total e IgMs

[0167] O método de detecção multiplex de acordo com a invenção foi também utilizado para a dosagem de Igs anti-*Treponema pallidum* total e IgMs anti-*Treponema pallidum*, *Treponema pallidum* sendo um agente bacteriano infeccioso responsável pela sífilis. Este método é ilustrado na **Figura 6** e descrito a seguir.

Materiais e métodos:

Materiais:

[0168] O material utilizado é equivalente ao dos exemplos 2 e 3, com exceção das partículas, do conjugado biotinilado 1 e das amostras testadas.

1. Fase sólida:

[0169] Dois grupos distintos de partículas superparamagnéticas Luminex™ (Luminex Corp, Austin, Texas, Estados Unidos) são utilizados.

- Grupo 1: anticorpo monoclonal de camundongo IgM anti-humano (Hytest, Finlândia) imobilizado em 2,5 µg / mg de partículas;
- Grupo 2: antígenos recombinados TpN17 e TpN47 do *Treponema pallidum* (New Market Laboratories Ltd, Kentford, Inglaterra) imobilizados, respectivamente, com 5 µg / mg e 1,25 µg / mg de partículas.

2. Conjugado 1:

[0170] Antígenos recombinados TpN17 e TpN47 (New Market Laboratories Ltd, Kentford, Inglaterra) marcados com biotina (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos).

3. Amostras:

[0171] As amostras humanas analisadas são amostras de plasma ou de soro que são positivas ou negativas para as imunoglobulinas anti- *Treponema pallidum* total e/ou IgM anti- *Treponema pallidum*.

[0172] Essas amostras são provenientes de bibliotecas de amostras internas:

Français du Sang (EFS) [banco de sangue Francês] - 83 rue des Alpes, 94150 Rungis, França,

ou a partir de amostras vendidas pelas empresas:

PromedDx - 10 Commerce Way, Norton, MA 02766, Estados Unidos,

SeraCare Life Science - 375 West Street, West Bridgewater, MA 02379, Estados Unidos.

[0173] As amostras humanas analisadas podem ser divididas em:

- **35 amostras** negativas para imunoglobulinas anti-*Treponema pallidum* totais e IgM anti-*treponema pallidum* (duplo negativas).
- **3 amostras** positivas para imunoglobulinas anti-*Treponema pallidum* totais e negativas para IgM anti-*Treponema pallidum* (amostras 1, 2, 3).
- **4 amostras** positivas para IgM anti-*Treponema pallidum* e negativas para imunoglobulina anti-*Treponema pallidum* totais (amostras 4, 5, 6, 7).

Métodos:

Protocolos de Ensaio:

[0174] Os protocolos utilizados são idênticos aos protocolos A, B e C acima descritos no exemplo 2, com exceção dos volumes na etapa 1, que são 100 µl para a amostra e 100 µl para as pérolas, e na etapa 2, que é 100 µl de solução de conjugado 1 (antígenos biotinilados de *Treponema pallidum*).

[0175] Os outros passos são idênticos, incluindo a etapa de interpretação.

Interpretação dos resultados:

[0176] Para o ensaio de Igs anti-*Treponema pallidum* total e das IgMs anti-*Treponema pallidum*, o valor de corte é a média dos IRFs das amostras negativas dividido por 0,3.

[0177] A proporção da amostra calculada relativa em relação ao valor de corte é, portanto, a seguinte:

$$\text{Quociente de amostra} = \frac{\text{média* do sinal RFI da amostra}}{\text{valor de corte}}$$

[0178] As amostras cujos índices são superiores ou iguais a 1 são declaradas positivas, para as quais as relações que são menos de 1 são declaradas negativas.

[0179] * Todos os ensaios de amostras humanas são realizados em triplicata e os resultados RFI utilizados provêm da média das três repetições.

Resultados obtidos:

Tabela 8: Comparação das dosagens de amostras para Igs anti-*Treponema pallidum* totais pelo formato de sanduíche de unidade e por multiplex de acordo com a invenção

		Formato Sanduíche da Unidade de Ig Total		Formato Sanduíche Multiplex de Ig Total	
		RFI	Proporção	RFI	Proporção
Valor de corte [0180] negativo média / 0,3		80	1,00	80	1,00
Amostras negativas para IgG anti-<i>Treponema pallidum</i> e negativas para IgM anti-<i>Treponema pallidum</i> [0181] Média (n = 35)		24	0,30	24	0,30
Amostras positivas para IgG anti-<i>Treponema pallidum</i> e negativas para IgM anti-<i>Treponema pallidum</i> (n = 3)	1	750	9,38	877	10,96
	2	2064	25,80	2417	30,21
	3	10471	130,89	13000	162,50

[0182] Distinção muito boa é observada entre as amostras negativas (n = 35) e as amostras positivas (n = 3) no ensaio

sanduíche de Ig anti-*Treponema pallidum* total, independentemente se é realizado pelo formato por unidade ou por multiplex de acordo com a invenção.

[0183] Estes resultados demonstram que a detecção de Igs anti-*Treponema pallidum* totais não é desensibilizada no método multiplex de acordo com a invenção.

[0184] Todas as amostras positivas são realmente consideradas positivas pelo método de acordo com a invenção, que assim torna possível também obter boa sensibilidade clínica.

Tabela 9: Comparação do ensaio de amostras para IgM anti-*Treponema pallidum* por formato de imunocaptura de unidade e pelo formato multiplex de imunocaptura de acordo com a invenção

	Formato de imunocaptura de Unidade de IgM			Formato de imunocaptura Multiplex de IgM	
	RFI	Proporção	RFI	Proporção	
Valor de corte negativo média / 0,3	150	1,00	152	1,00	
Amostras negativas para anticorpos IgG anti- <i>Treponema pallidum</i> e IgM anti- <i>Treponema pallidum</i> Média (n = 35)	45	0,30	46	0,30	
Amostras positivas para IgG anti- <i>Treponema pallidum</i> e negativas para IgM anti- <i>Treponema pallidum</i> (n = 3)	1	38	0,25	38	0,25
	2	51	0,34	58	0,38
	3	38	0,25	41	0,27

Amostras positivas para IgG anti-<i>Treponema pallidum</i> e negativas para IgM (total) anti-<i>Treponema pallidum</i> (n = 4)	4	286	1,91	241	1,59
	5	185	1,23	192	1,26
	6	996	6,64	884	5,82
	7	293	1,95	324	2,13

[0185] Distinção muito boa é observada entre as amostras negativas para IgM anti-*Treponema pallidum* (n = 35 + 3) e as amostras positivas para IgM anti-*Treponema pallidum* (n = 3) no ensaio por imunocaptura de IgM anti-*Treponema pallidum*, independentemente se é realizado pelo formato de unidade ou por multiplex de acordo com a invenção.

[0186] Estes resultados demonstram que a detecção de IgMs por imunocaptura não é desensibilizada pela combinação com o ensaio sanduíche no método multiplex de acordo com a invenção.

[0187] Todas as amostras positivas são realmente consideradas positivas pelo método de acordo com a invenção, que assim torna possível a obtenção de boa sensibilidade clínica.

[0188] Em conclusão, os resultados obtidos nos exemplos 2, 3 e 4, utilizando o método multiplex de acordo com a invenção, que combina a detecção de IgM por imunocaptura e detecção de Ig total por sanduíche, mostram claramente que o método de acordo com a invenção permite a detecção sensível e a diferenciação de anticorpos da classe de Ig total ou IgGs e IgMs, dirigidos contra o mesmo microorganismo. Esses hábeis na arte irão facilmente concluir que o método para a detecção multiplex de IgGs e IgMs de acordo com a invenção é, de fato, um método de âmbito geral, que pode ser adaptado para muitos microorganismos para os quais é importante, do ponto de diagnóstico, para detectar Igs total e IgMs.

[0189] Além disso, o método da invenção pode ser facilmente automatizado através da utilização de um dispositivo automático, como, por exemplo, BioPlex 2200 da Bio-Rad, que permite que os protocolos de ensaio sejam realizados simultaneamente e rapidamente, em um recipiente único, e os sinais sejam lidos em uma única etapa.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a detecção e diagnóstico *in vitro* de uma infecção por um microorganismo, **caracterizado** por consistir da detecção simultânea das imunoglobulinas G ou das imunoglobulinas totais e das imunoglobulinas M dirigidas contra o dito microorganismo, presentes em uma amostra biológica, onde o método compreende as seguintes etapas:

a) colocar a dita amostra biológica, em um recipiente único de ensaio, na presença de partículas superparamagnéticas, cada uma carregando pelo menos um parâmetro físico específico detectável, e pertencentes a pelo menos dois grupos diferentes, um dos grupos carregando um anticorpo de captura anti-IgM e o outro grupo carregando um antígeno de captura derivado do dito microorganismo,

b) incubar a mistura por um tempo de 15 a 40 minutos à temperatura de 37°C para a formação de imunocomplexos em cada grupo de partículas,

c) eliminar as imunoglobulinas, que não tenham ligação com a partículas,

d) incubar a mistura da etapa b) com pelo menos um conjugado marcado, o dito pelo menos um conjugado composto exclusivamente de um antígeno de detecção derivado do dito microorganismo,

e) eliminar o antígeno de detecção não ligado aos imunocomplexos da etapa b),

f) detectar simultaneamente, por meio de um detector capaz de diferenciar os dois grupos de partículas acima mencionadas, os imunocomplexos da etapa d) em cada partícula, onde a presença ou ausência de imunoglobulinas G ou imunoglobulinas totais e / ou imunoglobulinas M dirigidas contra o dito microorganismo é revelada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o antígeno derivado do microorganismo ser selecionado do grupo consistindo de um lisado do dito microorganismo, um de seus antígenos naturais que tenha sido semi-purificado ou purificado, uma proteína recombinante, um fragmento desta e um peptídeo sintético.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que os grupos das ditas partículas diferem entre si em virtude de fluorocromos, detectáveis por um detector adequado.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o detector adequado é um citômetro de fluxo.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o antígeno de detecção

carrega uma biotina que é revelada pela adição de avidina ou estreptavidina marcada.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que a amostra biológica é plasma ou soro.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que a amostra biológica é de origem humana.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que o dito microorganismo é escolhido do grupo que consiste de vírus, bactérias e parasitas unicelulares.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o dito microorganismo é escolhido do grupo que consiste de vírus da hepatite humana.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o dito microorganismo é escolhido do grupo consistindo por vírus da hepatite A humana (VHA) e o vírus da hepatite B humana (VHB).

11. Método de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o dito microorganismo é o vírus da hepatite A humana (VHA) e que um limite inferior de detecção de imunoglobulinas anti-VHA totais de 20 mIU / ml é obtido.

12. Método de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o dito microrganismo é *Treponema pallidum*.

FIGURA 1

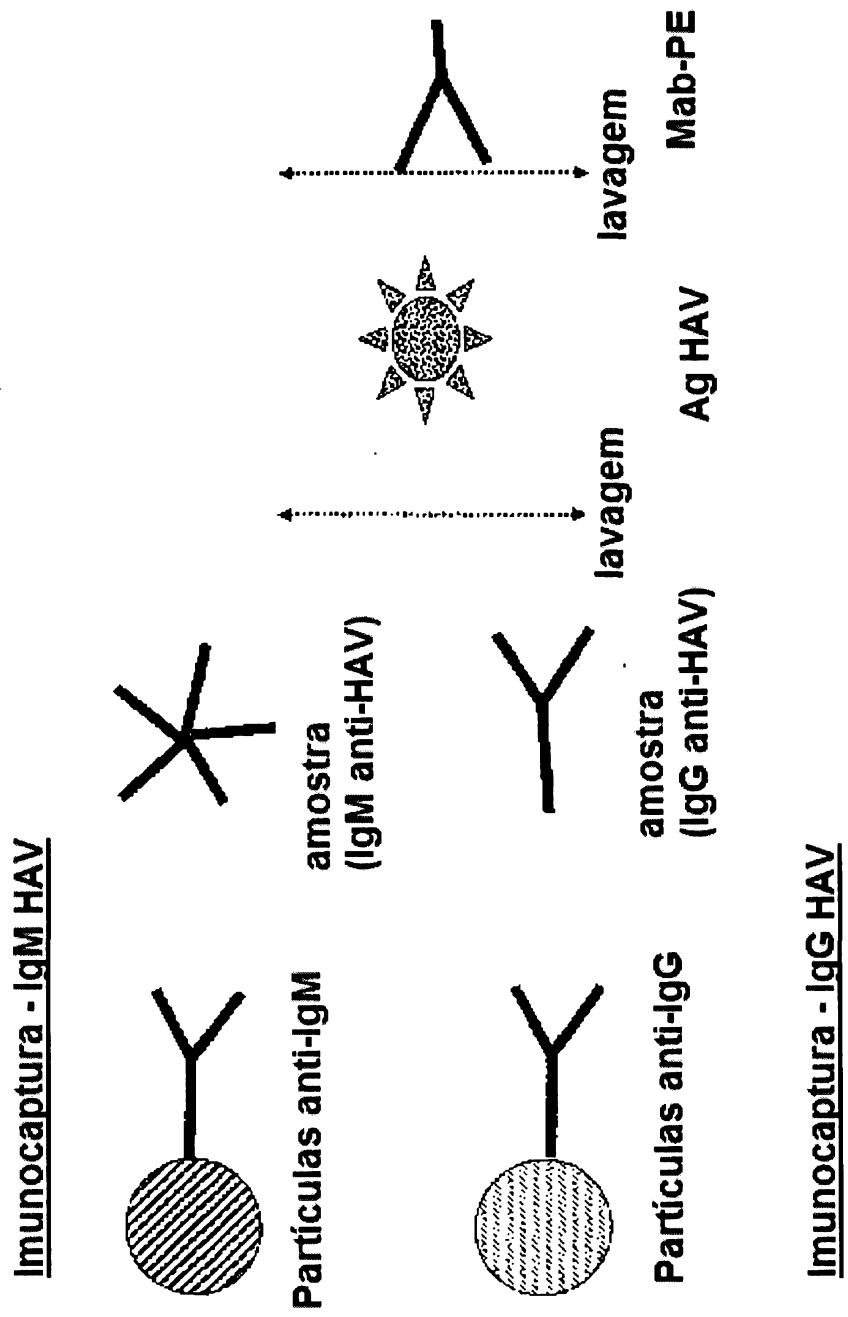


FIGURA 2

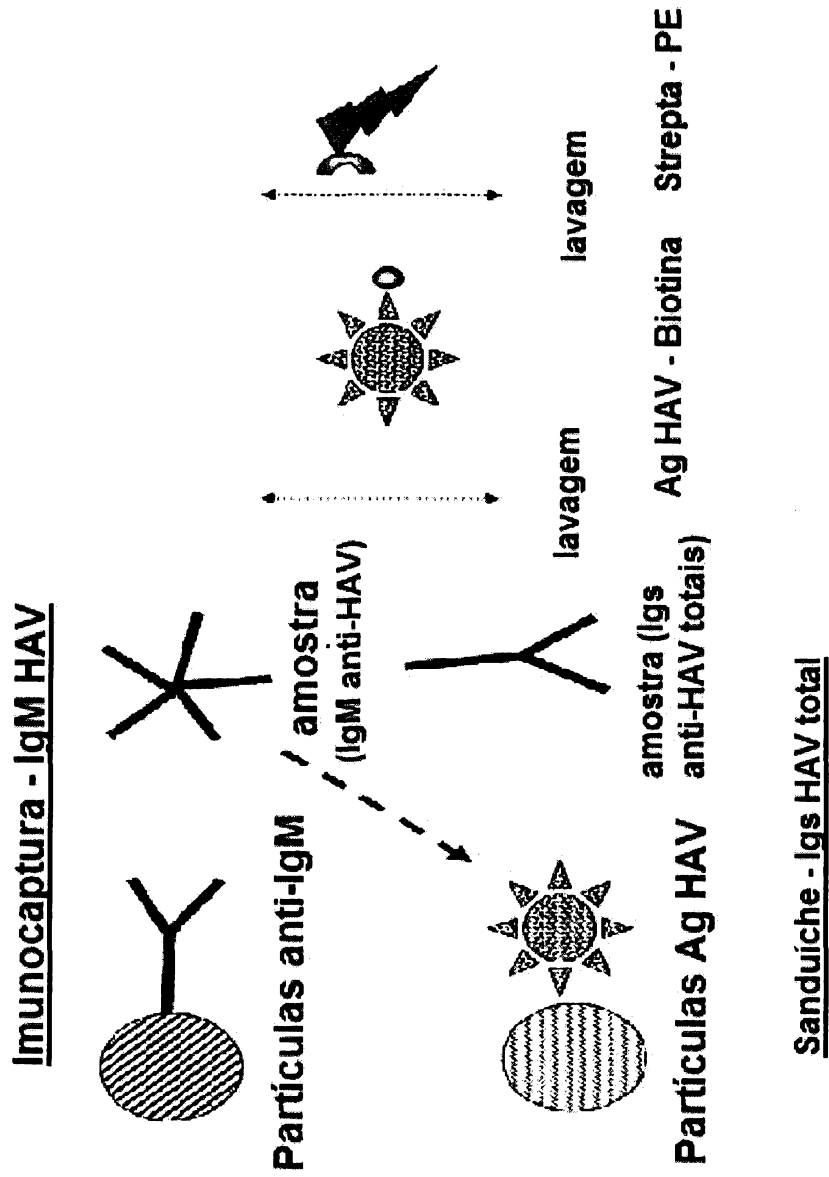


FIGURA 3

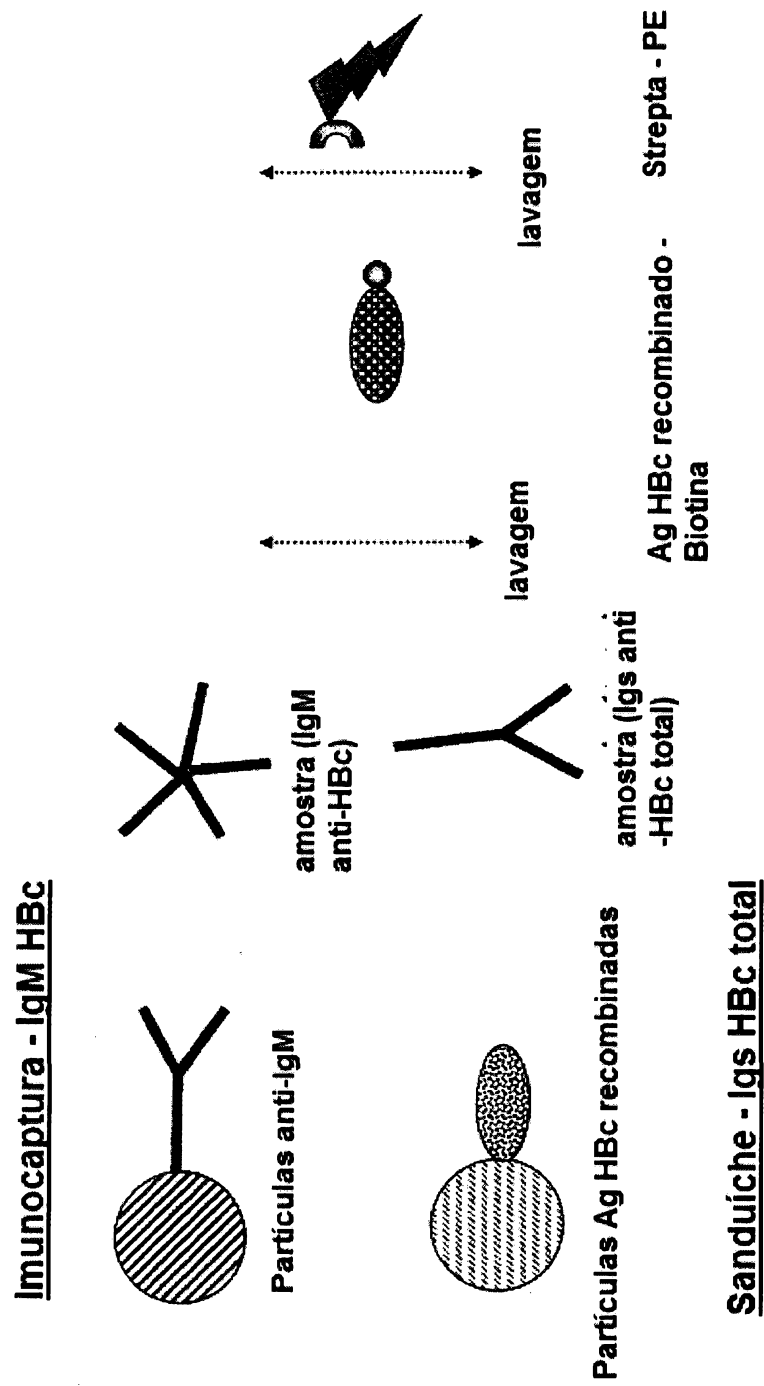


FIGURA 4

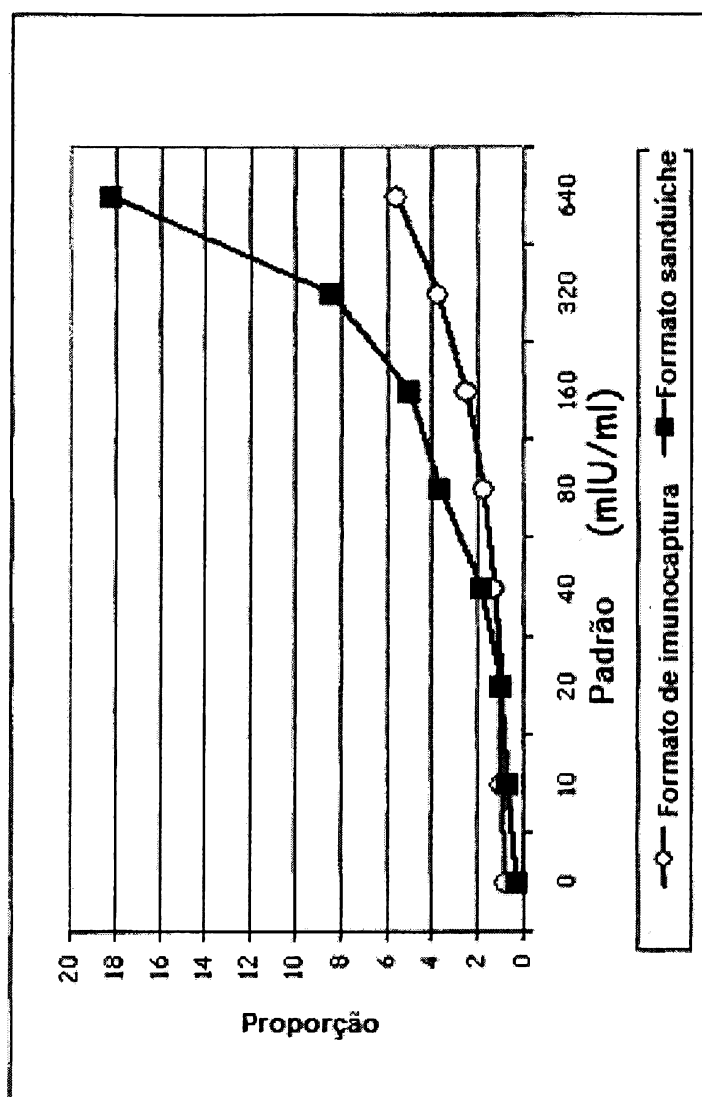


FIGURA 5

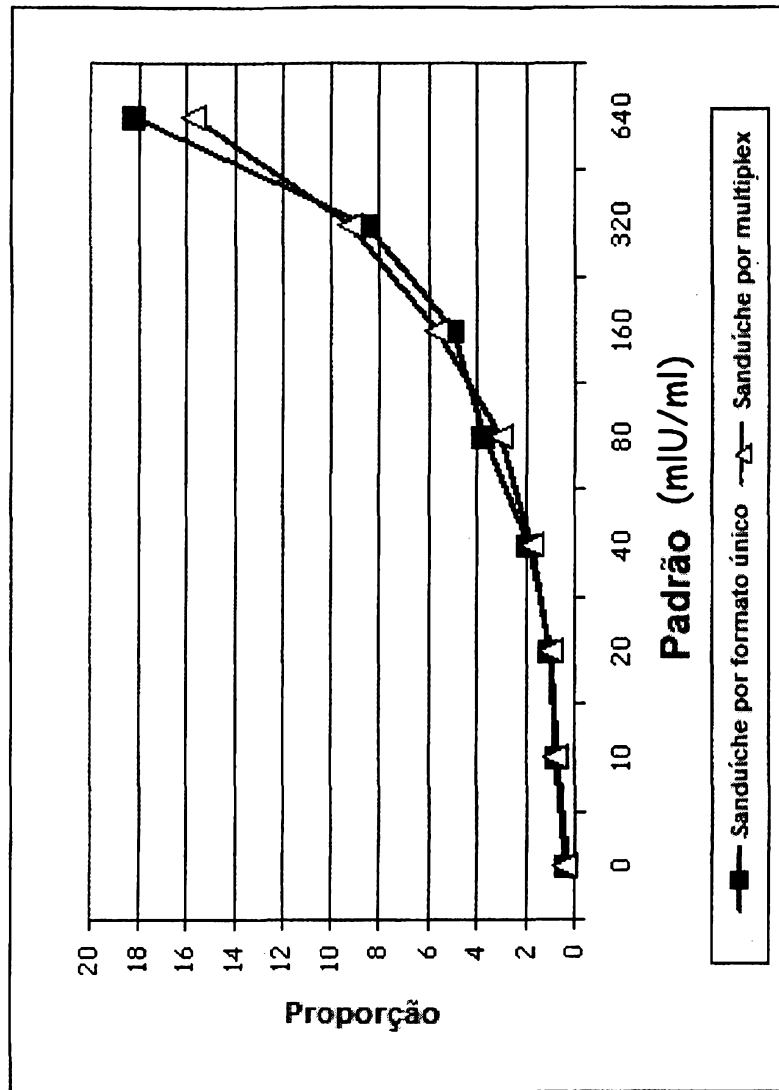
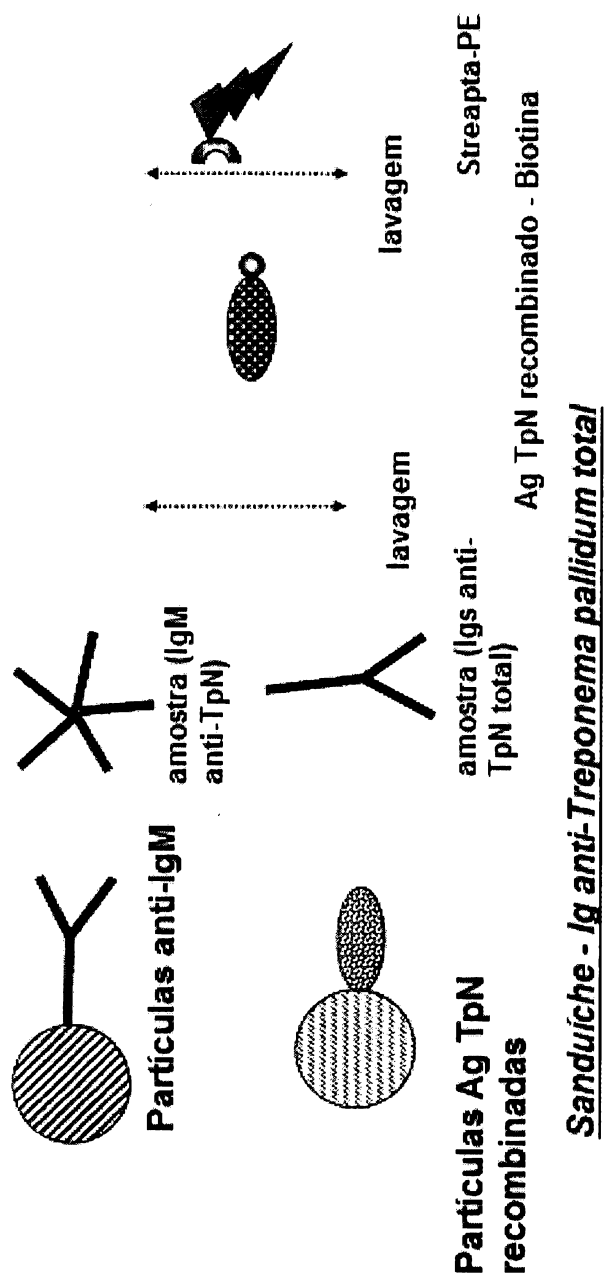


FIGURA 6

Imunocaptura - IgM anti-Treponema pallidum



Sanduiche - Ig anti-Treponema pallidum total