

BR 9228245
INIS - BR -- 2849

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SEPARAÇÃO DE RADIOIMUNOENSAIOS EM
FASE MAGNÉTICA, COM PARTÍCULAS PREPARADAS
NO IPEN E SUA COMPARAÇÃO COM AS
METODOLOGIAS CONVENCIONAIS

EMERSON AZEVEDO DE ARAÚJO

Tese apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do
grau de Doutor em Tecnologia
Nuclear.

Orientador:

Dr. Paolo Bartolini

SÃO PAULO

1 9 9 1

A todos que diretamente
colaboraram para a realização des-
te trabalho, dedico e agradeço.

Tese realizada nos
laboratórios da Divisão de
Medicina (TBM) do Institu-
to de Pesquisas Energéti-
cas e Nucleares - CNEN/SP.

SEPARAÇÃO DE RADIOIMUNOENSAIOS EM FASE MAGNÉTICA, COM PARTÍCULAS PREPARADAS NO IPEN E SUA COMPARAÇÃO COM AS METODOLOGIAS CONVENCIONAIS.

EMERSON AZEVEDO DE ARAÚJO

RESUMO

Neste trabalho, foram fixados dois objetivos principais. O primeiro foi a preparação dos reagentes para a execução da técnica de separação em fase magnética, útil tanto para o radioimunoensaio como para o mais moderno e eficiente ensaio imunorradiométrico. O segundo objetivo, de ordem teórico-prático e diretamente ligado ao primeiro, foi a realização de um estudo sobre a precisão desta técnica comparando os produtos sintetizados com os produtos importados e com duas técnicas tradicionais de separação em fase líquida: o segundo anticorpo e polietilenoglicol (PEG). Esta análise foi realizada utilizando perfis de precisão construídos de acordo com as recomendações de R.P. Ekins.

Com relação à primeira meta, podemos afirmar que tanto o separador magnético preparado com materiais exclusivamente nacionais, quanto a partícula sintetizada a partir do segundo anticorpo produzido nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP e de celulose magnetizada adquirida da SCIPAC Limited, Londres, foram de qualidade perfeitamente comparável aos produtos importados. As ligações específicas obtidas, geralmente

superiores a 30%, juntamente com ligações inespecíficas geralmente inferiores a 2%, permitiram a realização de ensaios exatos, precisos, práticos, econômicos e flexíveis quanto à obtenção dos reagentes.

O estudo relativo à precisão dos ensaios que utilizam as diferentes técnicas descritas, mostrou que as separações em fase magnética apresentam maior grau de precisão e maior intervalo de determinação, seguidas pela técnica do segundo anticorpo. A técnica que utiliza o PEG mostrou uma certa irreprodutibilidade dos resultados. Especulou-se que o elevado desempenho das partículas preparadas no IPEN, que apresentaram constantemente o maior intervalo de determinação, seria devido à qualidade do anticorpo usado no acoplamento ou à utilização de produtos recém-acoplados. Um maior espaço de tempo entre o acoplamento e o uso das partículas importadas, poderia ser responsável por um certo "bias" encontrado em sua utilização.

A comparação da análise de precisão realizada manualmente com aquela realizada mediante processamento automático de dados, demonstrou resultados divergentes e às vezes pouco discriminativos. Isto nos levou a recomendar cautela na utilização de programas de "software" não previamente conhecidos e testados em seu aparato estatístico.

SEPARATION OF RADIOIMMUNOASSAYS IN MAGNETIC PHASE, WITH
PARTICLES PREPARED AT THE IPEN AND ITS COMPARISON WITH
CONVENTIONAL METHODOLOGIES.

EMERSON AZEVEDO DE ARAÚJO

ABSTRACT

In the present work two main objectives were chosen. The first was the preparation for the execution of the magnetic phase separation technique, useful for the radioimmunoassay as well as for the most modern and most efficient immunoradiometric assay. The second objective, of a theoretical-practical kind and directly linked to the first, was the realization of a study about the precision of the technique with synthesized products compared with imported products and with two liquid phase separation techniques: the second antibody and polyethyleneglycol (PEG). This analysis was performed with the help of precision profiles built according to R.P.Ekins' recommendations.

As for the first aim, we can assert that both the magnetic separator that was made of exclusively national materials and the particle synthesized from the second antibody, produced in the IPEN - CNEN/SP laboratories, and from magnetized cellulose purchased from SCIPAC Limited, London, were (very much) comparable to the imported products

in quality. The specific bindings obtained, generally superior to 30%, together with non-specific bindings, generally inferior to 2%, has allowed the elaboration of exact assays, precise, practical, economical and flexible in obtaining the reactants.

The study of the precision of the assays that use the different techniques described here has shown that the magnetic phase separations present the highest degree of precision and a higher determination interval, followed by the second antibody technique. The technique that uses PEG has shown a certain irreproducibility in its results. It was speculated that the good performance of the particles prepared in the IPEN - they constantly present the biggest determination interval - was due to the quality of the antibody used during the coupling or to the utilization of newly-coupled products. A longer time interval between the coupling and the utilization of the imported particles might be responsible for a certain bias found in their use.

The comparison with an analog precision analysis performed by means of automatic data processing has shown divergent results, sometimes not very discriminative with respect to the manual method. This has led us to recommend a certain care in the use of software not previously known and tested in its statistical facilities.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	01
2 - MATERIAIS	11
2.1 - Equipamentos	11
2.2 - Reagentes	13
2.3 - Materiais biológicos	15
2.4 - Soluções	16
3 - MÉTODOS	18
3.1 - Marcação do hTSH com ^{125}I e purificação do produto marcado obtido	18
3.2 - Determinação da ótima diluição do 1º An- ticorpo	22
3.3 - Radioimunoensaios	23
3.3.1 - Incubação	23
3.3.2 - Técnica de separação mediante o 2º Anti- corpo em fase líquida	24
3.3.3 - Técnica de separação mediante o PEG 6000..	25
3.3.4 - Técnica de separação em fase magnética ...	25
3.4 - Programa computacional	26
3.5 - Método de preparação do 2º Anticorpo Aco- plado a celulose magnetizada	27

3.6	- Construção de um separador magnético nacional	29
3.7	- Método de análise dos resultados dos perfis de precisão	30
3.7.1	- Construção de perfis de precisão obtidos com "n" replicatas da curva padrão	30
3.7.2	- Construção de perfis de precisão obtido mediante duplicatas de "n" desconhecidos..	32
4	- RESULTADOS	34
4.1	- Controle de qualidade do separador magnético IPEN em comparação com o importado ..	34
4.1.1	- Comparação das curvas de radioimunoensaio.	34
4.1.2	- Comparação dos perfis de precisão	39
4.2	- Preparação e controle de qualidade das partículas magnéticas preparadas no IPEN ...	41
4.2.1	- Padronização da técnica de acoplamento com o metaperiodato de sódio	41
4.2.1.1	- Resultados do acoplamento com o protocolo original	41
4.2.1.2	- Modificação da concentração dos reagentes utilizados no acoplamento e do tipo de partícula...	42
4.2.1.3	- Resultados do protocolo final de acoplamento	43
4.2.1.4	- Acoplamento com o 2º Anticorpo produzido no IPEN	44
4.2.1.5	- Acoplamento com a partícula magnética M 100	46
4.2.1.6	- Variação do tempo de separação	47

4.2.2	- Rendimento do acoplamento	48
4.2.3	- Estabilidade das partículas	50
4.3	- Radioimunoensaio de hTSH	52
4.4	- Análise dos perfis de precisão das quatro formas de separação	62
4.4.1	- Perfis obtidos mediante "n" replicatas da curva	62
4.4.1.1	- Dados para a obtenção do perfil de precisão do ensaio separado com a partícula IPEN...	62
4.4.1.2	- Dados para a obtenção do perfil de preci- são da separação com a partícula magnética importada	66
4.4.1.3	- Dados para a obtenção do perfil de preci- são da separação em fase líquida, usando o 2º Anticorpo IPEN	68
4.4.1.4	- Dados para a obtenção do perfil de preci- são do ensaio separado com o polietileno- glicol	71
4.4.1.5	- Perfis de precisão	74
4.4.2	- Perfis de precisão obtidos mediante duplí- catas de "n" desconhecidos	89
4.4.2.1	- Dados obtidos para a obtenção do perfil de precisão da separação com a partícula IPEN de "n" desconhecidos	89
4.4.2.2	- Dados para a obtenção do perfil de preci- são com partículas magnéticas importadas (SCIPAC, Limited), de um ensaio de hTSH com "n" desconhecidos	92

4.4.2.3 - Dados para a obtenção do perfil de precisão com o 2º Anticorpo IPEN, de um ensaio de hTSH com "n" desconhecidos 95

4.4.2.4 - Dados para a obtenção do perfil de precisão com o polietilenoglicol 98

4.4.2.5 - Perfis de precisão 101

4.5 - Erro sistemático "BIAS", devido a técnica de separação 111

5 - DISCUSSÃO 119

6 - CONCLUSÃO 129

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 130

1 - INTRODUÇÃO

A análise por saturação é o termo genérico proposto primeiramente por Ekins em 1960 (26), para designar o tipo de análise onde ocorria uma saturação progressiva de um dos reativos pela substância que se deseja dosar. O sistema mais conhecido relativo a este tipo de análise é o Radioimunoensaio (RIE) no qual os reagentes empregados são um antígeno (Ag) e o respectivo anticorpo (Ac). Outros tipos de análise por saturação empregam vários agentes reativos, por exemplo, receptores de membranas, proteínas carreadoras e enzimas.

A aplicação desta técnica a estas diferentes substâncias recebeu denominações específicas e hoje encontram-se bastante difundidas sob a forma de radioimunoensaio, radioreceptores, análise radioenzimática, competição proteica, etc., porém o princípio geral é sempre o mesmo, conforme o esquema da figura 1, a seguir.

O radioimunoensaio foi desenvolvido a partir do trabalho pioneiro publicado em 1960, por Yalow e Berson (84). A importância deste método reside, de um lado, em permitir a determinação de pequenas quantidades de reagentes, da ordem de até nano e picogramas. Por outro lado a determinação qualitativa das substâncias é altamente específica, decorrente do caráter imunológico da reação. A aplicação desta

técnica à dosagem de hormônios protéicos ou peptídicos, desde o seu desenvolvimento, propiciou novos conhecimentos sobre a ação desses hormônios e os equilíbrios envolvidos.

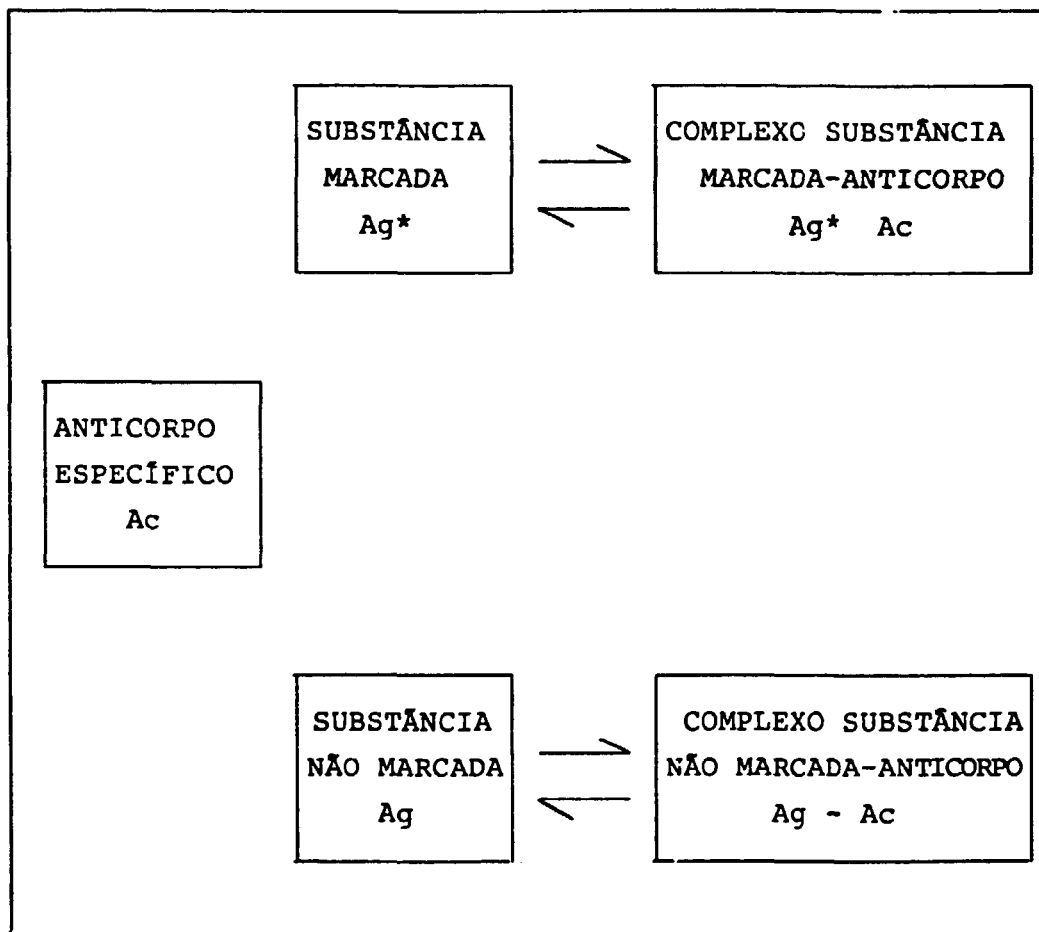


Figura 1: Princípio de uma reação por competição.

No RIE o fluido biológico contendo a substância (Ag) a ser dosada é incubada com a mesma substância marcada (Ag*), as duas tendo igual oportunidade de unirem-se a uma outra substância ligante (Ac), para formar um complexo estável. A substância ligante (Ac), em defeito com relação à substância que pode ser ligada (Ag), permite a obtenção de duas frações: uma livre e outra ligada. Estas frações são separadas e me-

didas, determinando-se a concentração de (Ag) no fluido biológico original em comparação com quantidades conhecidas.

Se a competição estabelecida entre Ag e Ab continuar até que um equilíbrio de massa seja atingido, o ensaio será chamado de saturação de equilíbrio. Por outro lado, se a saturação do ligante (Ab) é dividida em duas etapas consecutivas (a primeira empregando-se antígeno não marcado e a segunda antígeno marcado) com a reação interrompida antes do equilíbrio ser alcançado, o ensaio é chamado de análise não equilibrada ou saturação sequencial (85).

Em termos práticos, a maioria dos radioimunoensaios é do tipo saturação de equilíbrio. A análise não equilibrada é usada com pouca frequência, sendo especificamente indicada quando há uma grande diferença na afinidade dos antígenos marcado e não marcado frente ao ligante, ou quando é necessário alcançar uma sensibilidade que não é possível obter com outras formas de reação.

Após um tempo determinado, o complexo (fração ligada) é separado do antígeno livre (fração livre), o que sem dúvida alguma corresponde a um dos aspectos fundamentais da técnica de radioimunoanálise (17, 42, 64).

Os fatores que devem ser levados em consideração para a escolha de um método de separação são os seguintes (14, 32, 65).

- obtenção de uma completa separação, sem influências recíprocas das frações livre e ligada (ou seja, sem erros de "misclassificação");

- rapidez e praticidade na separação;
- aplicação generalizada ao RIE de vários analitos;
- custo do material.

Com o propósito de separar as frações livre e ligada são empregados vários métodos, sendo os mais conhecidos:

- Separação baseada em técnicas de adsorção

As proteínas de baixo peso molecular têm a propriedade de adsorverem-se a certos materiais sólidos, possivelmente, pela interação entre os resíduos de aminoácidos cíclicos com a superfície de certos materiais (58), como por exemplo, vidro moido, sílica (36) talco, Sephadex (78), Sepharose (57) e carvão recoberto com Dextran. Este último foi um dos reagentes mais empregados, pois adsorve essencialmente moléculas de baixo peso molecular como as iodotironinas e esteróides (06, 23, 28, 38, 39, 44, 56,63).

- Precipitação não específica

A fração ligada pode ser precipitada, usando-se produtos orgânicos como o Polietilenoglicol (PEG) (32) ou sais inorgânicos como o Sulfato de Amônia (15) os quais têm a propriedade de subtrair moléculas de H₂O de hidratação, diminuindo assim, a solubilidade das proteínas. Estes métodos têm como principal vantagem a possibilidade de poder estocar e utilizar grandes quantidades de um reagente de baixo custo, quimicamente controlado, proporcionando uma "continuidade de rea-

gente", fator de grande praticidade e reprodutibilidade. Apresentam, porém, frequentes dificuldades na obtenção de baixas ligações inespecíficas.

- Imunoprecipitação

Neste método, as frações ligada e livre são separadas mediante um segundo anticorpo produzido contra a imunoglobulina da espécie onde foi produzido o 1º Anticorpo, formando um complexo que é facilmente separado por centrifugação (76).

O mesmo 2º Anticorpo pode obviamente ser aplicado em todos os ensaios que utilizam um 1º Anticorpo produzido na mesma espécie animal que forneceu a gama globulina para a produção deste antissoro. Este reagente porém necessita ser produzido em grande quantidade, pois dificilmente apresenta título alto e, portanto, é utilizado pouco diluído, além de apresentar características variáveis de ligação que aumentam a irreprodutibilidade interlotes. É também um método bastante oneroso, pois necessita de um produto que contenha gama globulinas de alta avidéz, geralmente de alto custo.

Com a associação de um agente precipitante, como por exemplo, o Polietilenoglicol (25), pode-se reduzir a quantidade de 2º Ac e o tempo de ensaio com considerável economia.

- Separação em fase sólida

Neste método, tanto o 1º Anticorpo (01, 24, 51, 75, 80, 81) como o 2º Anticorpo (21, 48) e antígenos (60) podem

ser acoplados a suportes como discos, esferas, o próprio tubo de ensaio de plástico ou de vidro (11), ou partículas como Sephadex, Sephacril e celulose (34), que se separam de várias formas.

Os métodos utilizados para a imobilização na fase sólida são:

- a. **Adsorção física**, que pode ser influenciada pelo pH, temperatura, força iônica e o ponto isoelétrico das proteínas e inibida por certos reagentes, como por exemplo, o Tween 20.
- b. **Ligação química covalente**, realizada pela fixação da proteína a polímeros ou membranas semipermeáveis (10) por meio de enzimas (20, 47) ou utilizando reagentes químicos, como o Brometo de Cianogênio (04, 07, 79), o Carbonildiimidazol (05, 12, 13, 37, 50), o Metaperiodato de Sódio (35, 71, 72, 83), e a associação destes com o Tolueno-sulfenil (52, 53) e o Ácido Tresilclorídrico (54).

O método de separação em fase sólida, pode também ser utilizado nos ensaios imunorradiométricos, onde os anticorpos marcados radioisotopicamente estão presentes em excesso de reagentes, obtendo-se assim uma maior sensibilidade dos ensaios (19) e um intervalo muito mais amplo de determinação.

A principal vantagem deste método é a simplicidade de separação, pois o complexo Ag - Ac em fase sólida é in-

solúvel, podendo ser separado da fração livre por uma simples filtração, decantação, aspiração ou com uma força centrífuga mínima. Caso o anticorpo esteja ligado a partículas de Sephacril a separação pode ser feita com uma solução de Sacarose (82). Os imunocomplexos podem ser lavados com facilidade e eficiência, diminuindo com isto, o valor das ligações inespecíficas. Porém, podem ocorrer alterações nas propriedades de ligação do anticorpo imobilizado, fazendo com que o Ac fixado possa apresentar características diferentes do Ab nativo.

- Separação em fase sólida magnética

Este método de separação foi desenvolvido visando uma minimização de custo e tempo e evitar o uso da centrífuga. Ele tem como característica principal a utilização de um campo magnético, que atua de uma maneira muito simples e prática como agente separador das frações.

Em analogia ao acoplamento de proteínas e especificamente de anticorpos (34) a suportes já totalmente conhecidos, Robinson (68) iniciou o desenvolvimento de suportes magnéticos para a imobilização de anticorpos usando reagentes enzimáticos.

Era agora necessário, a preparação das partículas que apresentassem as melhores características. A partir de 1974, Hersh (40) e Nye (55), estudaram simultânea e independentemente, partículas de Óxido Ferroso Férrico (Fe_3O_4), associadas ao Enzacril, nome comercial de um polímero do Fe_3O_4 , tendo o Silicone Tetraédrico como suporte, tanto

para as partículas como para o anticorpo. Foi então desenvolvido um radioimunoensaio em fase magnética para a Digoxina e chegou-se a conclusão que estas partículas seriam preferidas na rotina dos ensaios por causa da: alta reprodutibilidade dos resultados; alta resposta ao campo magnético; aplicação em qualquer radioimunoensaio; estabilidade em solução aquosa; pequeno custo; facilidade de utilização e, finalmente, maior eficiência de adsorção devido ao seu pequeno tamanho (100 - 200 Å).

Utilizando-se dessas partículas Forrest (30) desenvolveu radioimunoensaios de tiroxina e cortisol, Ithakisios (43) produziu partículas magnéticas a partir do Ferrite de Bário. Guesdon (33) desenvolveu um enzimaensaio em fase magnética. Dawes (18) revestiu carvão mais Fe_3O_4 com gel de poliacrilamida e após liofilização e micronização, desenvolveu um radioimunoensaio de adsorção para a Digoxina e comparando com o método do carvão ativado, observou resultados similares. Em 1978 Kamel (45) produziu partículas magnéticas utilizando a celulose como suporte para determinar a concentração no soro humano do quimioterápico Metotrexate (MTX) e também acoplou um 2º Anticorpo à celulose, generalizando ainda mais a técnica e equiparando os resultados ao método do 2º Anticorpo em fase líquida (46). Estes trabalhos foram continuados por Pourfarzaneh em 1982 (61, 62), e, finalmente, Kubal (49) desenvolveu microesferas magnéticas utilizando os Óxidos de Manganês e de Ferro com Glicose Oxidase como agente adsorvente para o 2º Anticorpo.

Esta metodologia tem como principais vantagens, a

eliminação do processo de centrifugação, a redução do período da segunda incubação, a separação simultânea de um maior número de amostras, sem a necessidade de removê-las da estante durante o ensaio e a possibilidade de rápidas e repetidas lavagens do precipitado, visando menores valores de ligações inespecíficas. O custo do equipamento (separador magnético) é extremamente baixo, não requer assistência técnica, como também é baixo, o custo da partícula acoplada ao anticorpo, frequentemente menor que o custo do simples 2º Anticorpo.

O trabalho que segue tem por objetivos a produção de partículas magnéticas, a partir do acoplamento de um 2º Anticorpo à celulose contendo Óxido Ferroso Férrico (Fe_2O_3), a padronização de um ensaio hTSH em fase magnética e a sua comparação à ensaios que utilizam partículas importadas e outras metodologias clássicas de separação por fase líquida: 2º Anticorpo e PEG.

A escolha do hTSH neste trabalho, deveu-se ao fato do mesmo ser um dos mais solicitados na clínica endocrinológica, sendo por isto um dos radioimunoensaios mais frequentemente realizados em laboratórios clínicos. Também há grande interesse por parte da Agência Internacional de Energia Atômica, que há vários anos vem coordenado um programa dirigido à máxima nacionalização dos ensaios desse hormônio, para a detecção do hipotiroidismo neonatal na América Latina.

Na padronização do ensaio foram considerados dois aspectos principais. O primeiro relaciona-se à economia e maior praticidade da separação em fase magnética, especial-

mente válidas quando o acoplamento é realizado no mesmo laboratório que executa os ensaios: este aspecto prático-econômico será avaliado na discussão.

O segundo é, obviamente, aquele ligado a precisão. De acordo com a visão de R.P.Ekins (27) não se pode eleger uma técnica em relação a outra, ou introduzir qualquer modificação no esquema de um ensaio sem analisar seus efeitos sobre o parâmetro precisão, que é o mais característico e importante de um ensaio. Por isto, foi realizado um estudo para avaliar a influência neste parâmetro testando as diferentes técnicas de separação e também as diferentes partículas magnéticas. Este aspecto é ao mesmo tempo teórico e prático e utilizará o instrumento idealizado por Ekins, o Perfil de Precisão (P.P.) (29), que aqui será usado e analisado no seu mecanismo de aplicação bem como, nos seus resultados. Duas técnicas diferentes de construção dos P.P. serão empregadas neste trabalho: uma mais típica e fácil de ser utilizada em laboratórios que realizam exames de rotina, e outra com maior significância estatística, própria de um laboratório de pesquisa. A comparação entre as duas permitirá, além de uma maior confiabilidade nas conclusões alcançadas, também uma despretenciosa, porém útil, pesquisa de metodologia estatística, ligada à precisão dos radioimunoensaios.

2 - MATERIAIS

2.1 - Equipamentos

- Agitador magnético, modelo 257, marca Fanem, São Paulo, Brasil.
- Agitador mecânico do tipo "Vortex", modelo AT-56, marca Phoenix, São Paulo, Brasil.
- Balança analítica com precisão de 0,001 mg, marca Mettler, Zurique, Suíça.
- Balança semi-analítica com precisão de 0,1 g, modelo P 1000 N, marca Mettler, Zurique, Suíça.
- Bomba peristáltica, modelo 4912 A, marca LKB, Estocolmo, Suécia.
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC-2B, marca Sorvall, Connecticut, E.U.A.
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Spin VI, marca Incibrás, São Paulo, Brasil.
- Coluna cromatográfica de vidro (24 x 500 mm), construída no IPEN-CNEN, São Paulo, Brasil.

- Contador gama, tipo poço com detector de NaI (Tl), modelo 4.000, marca Beckman, Fullerton, E.U.A.
- Contador gama tipo poço com detector de NaI (Tl), modelo Cobra 5002, marca Packard, Meriden, E.U.A.
- Imãs permanentes de ferrite, produzidos pela TWM - Produtos Magnéticos Ltda., São Paulo, Brasil.
- Liofilizador, marca Edwards, São Paulo, Brasil.
- Microcomputador, modelo XT II, marca Itautec, São Paulo, Brasil.
- pHmetro, modelo B371, marca Micronal, São Paulo, Brasil.
- Pipêtas automáticas de vários volumes, marca Oxford, Foster City. E.U.A.
- Pipêtas automáticas de vários volumes, marca Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.
- Pipetas tipo Pasteur, fabricadas no IPEN-CNEN, São Paulo, Brasil.
- Repipetador automático, marca Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.
- Separador magnético, código R217, marca Scipac, Sittingbourne, Inglaterra.
- Seringas de 10 μ l, marca Hamilton, Reno, E.U.A.

- Sistema de homogenização por movimento circular vertical, marca Leec, Londres, Inglaterra.

2.2 - Reagentes

- Acetato de sódio anidro, Merck, Rio de Janeiro, Brasil.
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA), Carlo Erba, São Paulo, Brasil.
- Azida sódica P.A., Merck, Rio de Janeiro, Brasil.
- Azul dextran 2000, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Bicarbonato de sódio, Carlo Erba, São Paulo, Brasil.
- Etanolamina, Sigma Chemical Company, St Louis, E.U.A.
- Fosfato de sódio monobásico P.A., Carlo Erba, São Paulo, Brasil.
- Hidróxido de sódio, Grupo Química, Rio de Janeiro, Brasil.
- Iodeto de potássio P.A., Merck, São Paulo, Brasil.
- Metabissulfito de sódio P.A., Merck, São Paulo, Brasil.

- Metaperiodato de sódio P.A., Sigma Chemical Company, St Louis, E.U.A.
- Na ¹²⁵I em hidróxido de sódio 0,1 N, New England Nuclear, Boston, E.U.A.
- Partículas magnéticas, já acopladas ao 2º Anticorpo:
 1. DAMP R, código 22499, Serono Diagnostics, Coincins, Suíça.
 2. T 202, Scipac Limited, Londres, Inglaterra.
- Partículas magnéticas para acoplamento ao 2º Anticorpo.
 1. M-100 (Média Densidade, 50% de celulose + 50% de Óxido de Ferro), Scipac Limited, Londres, Inglaterra.
 2. M-104 (Baixa Densidade, 75% de celulose + 25% de Óxido de Ferro), Scipac Limited, Londres, Inglaterra.
- Polietilenoglicol 6000 (PEG), Atlas, São Paulo, Brasil.
- Sephadex G-100, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Tween 20, Merck, São Paulo, Brasil.

2.3 - Materiais biológicos

- 1º Anticorpo anti-TSH (coelho), NIADDK (National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Diseases) - anti-hTSH-3 (AFP - C611818), obtido no NIADDK, Baltimore, E.U.A., por doação.
- 2º Anticorpo carneiro-anti-coelho, Radioassay, Carlson, E.U.A.
- 2º Anticorpo carneiro-anti-coelho, IPEN-CNEN/São Paulo, Brasil.
- hTSH empregado para radioiodação, NIADDK - hTSH - I - 6 (AFP-87708), obtido do NIADDK, Baltimore, E.U.A., por doação.
- hTSH utilizado como padrão, NIADDK-hTSH-RP-1, obtido do NIADDK, Baltimore, E.U.A., por doação.
- Soroalbumina bovina, fração V, nº A4503, Sigma Chemical Company, St Louis, E.U.A.
- Soro normal de cavalo, obtido no IPEN-CNEN/São Paulo, Brasil.
- Soro normal de coelho, obtido no IPEN-CNEN/São Paulo, Brasil.
- Soro equino livre de hTSH, Seralab, Sussex, Inglaterra.

2.4 - Soluções

2.4.1 - Solução utilizada na radioiodação do hTSH

Tampão fosfato de potássio, 0,3 M, pH 7,4. Para purificação do marcado na coluna do Sephadex G-100, foram adicionados 0,1% de Soroalbumina bovina (SAB) neste mesmo tampão, variando-se apenas a molaridade para 0,05. Para dissolver a Cloramina T e o Metabissulfito utilizou-se tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4.

2.4.2 - Solução utilizada na incubação dos radioimunoensaios e diluições das partículas magnéticas (tampão de ensaio)

Tampão fosfato de sódio, 0,05 M, pH 7,4, 0,1% Soroalbumina bovina (SAB), 0,1% de Azida sódica, 0,01% de Tween 20.

2.4.3 - Soluções utilizadas nas separações dos radioimunoensaios

. Lavagem da fase magnética

Tampão fosfato de sódio, 0,05 M, pH 7,4.

. Diluição do 2º Anticorpo

Tampão fosfato de sódio, 0,05 M, pH 7,4, 10% de EDTA, 1% de Soro normal de coelho.

. Diluição do polietilenoglicol

Tampão fosfato de sódio, 0,05 M, pH 7,4 e para a lavagem do precipitado uma solução 0,4 M de Cloreto de sódio.

3 - MÉTODOS

3.1 - Marcação do hTSH com ^{125}I e purificação do produto marcado obtido

A radioiodação, ou seja, a ligação covalente de ^{125}I ou ^{131}I a um radical de tirosina da cadeia polipeptídica, é uma reação que produz proteínas marcadas para que possam ser usadas como traçadores em um sistema de radioimunoensaio (47).

As marcações do hTSH, foram realizadas em capela de exaustão devido a volatidade do ^{125}I , através de modificações (31) no método clássico de marcação radioisotópica proposto por Hunter e Greenwood (41), que utilizam quantidades fixas de um agente oxidante (Cloramina T) e de um agente redutor relativamente forte (Metabissulfito de sódio).

As reações foram realizadas na seguinte ordem: em um tubo de fundo cônico com dimensões de 12 x 75 mm, contendo 20 μl do tampão fosfato de potássio, 0,3 M, foram adicionados 10 μl de uma solução de hTSH em tampão fosfato de potássio, 0,05 M, equivalente a 5 μg do hormônio. Após leve agitação, adicionaram-se 800 μCi ou $1,09 \times 10^{16}$ Bq do ^{125}I seguido de 12 μl de uma solução de 0,07 mg/ml de Cloramina T (equivalentes a 0,8 μg) e após 5 minutos, adicionaram-se 5 μl de uma solução de 0,2 mg/ml de metabissulfito de sódio (equivalente a 1 μg), ambos no mesmo tampão fosfato. Em seguida, foram adicionados 200 μl de uma solução com 1 mg/ml de azul

dextran em tampão fosfato de potássio, 0,05 M pH 7,4, contendo 0,1% de soroalbumina bovina.

. Purificação do hTSH marcado:

O hTSH radioiodado foi purificado por cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G-100 média. Para montar a coluna de 24 x 500 mm, o pó seco foi previamente intumescido com tampão fosfato de potássio, 0,05 M pH 7,4 por 5 horas a 90°C e lavado várias vezes com o mesmo tampão. A coluna foi empacotada com a resina e lavada com 3 vezes o próprio volume do mesmo tampão contendo 0,1% de soroalbumina bovina (SAB). Após a aplicação da mistura de reação à coluna, a eluição foi realizada com o mesmo tampão de lavagem da coluna, aplicando um fluxo de 12 ml/hora. Foram coletadas 110 frações de 2 ml cada uma. De cada fração foi retirada uma alíquota de 20 µl, colocada em um cone de papel alumínio e sua radioatividade determinada em um contador gama (Nuclear Chicago). A partir dos dados obtidos, foi feito um cromatograma da purificação em cpm versus fração de eluição. Das frações correspondentes ao pico do hTSH marcado, reconhecido pelo seu coeficiente de distribuição (Kd) característico (67), obteve-se um "pool" alíquotado em volumes de 0,5 ml e congelado a -20°C.

. Cálculo da recuperação

Da mistura de marcação foram retiradas três alíquotas de 3 µl e adicionadas a três tubos de ensaio (tubos 1, 2 e 3), contendo 1000 µl do tampão utilizado para a eluição

da coluna. De cada um dos tubos foram retirados 10 μ l e levado ao contador gama, juntamente com as ponteiras utilizadas, o tubo onde foi realizada a marcação e a ponteira utilizada para aplicar o marcado à coluna.

A porcentagem de recuperação, foi obtida pela seguinte equação:

$$R = \frac{T}{A} \times 100$$

Onde:

A = Atividade total aplicada à coluna.

T = Atividade total recuperada nas frações.

A é calculada pela seguinte fórmula:

$$A = \frac{S \times 1000 \times V}{10 \times 3} \times \frac{V - 9}{V} - X$$

Onde:

S = Valor médio (cpm) das alíquotas de 10 μ l retiradas dos tubos 1, 2 e 3.

V = Volume da mistura de reação.

1000 μ l = Volume dos tubos 1, 2 e 3.

3 μ l = Volume retirado da mistura de marcação.

10 μ l = Volume das alíquotas dos tubos 1, 2 e 3.

X = Soma da radioatividade (em cpm) perdidas nas ponteiras e tubo cônico utilizados para marcação.

\underline{T} é calculado pela fórmula:

$$T = \sum_{i=1}^n f \times Y_i$$

Onde:

Y = Radioatividade (em cpm) presente em 20 μ l de cada fração de eluato da coluna, descontada a radiação de fundo.

n = Número de frações.

f = Fator de correção, dado pela relação volume da fração/volume da alíquota.

. Cálculo do rendimento da marcação

A partir do perfil radiocromatográfico obtido, foi levada em consideração para os cálculos do rendimento da marcação, a radioatividade total do pico de ^{125}I -hTSH.

A percentagem do rendimento de marcação %H* é dada por:

$$\%H^* = \frac{H^*}{T} \times 100$$

Onde:

H* = Radioatividade relativa ao hormônio radioiodado.

. Cálculo do coeficiente de distribuição

O cálculo do coeficiente de distribuição (Kd)

dado por:

$$Kd = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$$

Onde:

Ve = Volume de eluição do pico a ser examinado.

Vo = Volume de exclusão molecular, medido pelo volume de eluição do azul dextran.

Vt = Volume total da fase líquida da coluna, medido pelo volume de eluição do ^{125}I .

3.2 - Determinação da ótima diluição do 1º Anticorpo

A ótima diluição do 1º Anticorpo a ser empregada nos ensaios, foi determinada utilizando-se o método de separação por imunoprecipitação com um 2º Anticorpo (carneiro-anti-coelho) da Radioassay com diluição de 1:7 e por fase magnética, empregando-se a partícula DAMP-R da Serono Diagnostics, com uma quantidade previamente determinada de 2 mg por tubo.

Para este fim, incubaram-se em duplicata durante 24 horas a 4°C, 100 µl de tampão de ensaio, 100 µl de ^{125}I -hTSH contendo aproximadamente 10.000 cpm e 100 µl do 1º Anticorpo nas seguintes diluições: 1:10.000, 1:100.000, 1:200.000, 1:400.000, 1:800.000 e 1:1.600.000. Foram também incubados dois tubos sem o 1º Anticorpo, com o intuito de determinar a ligação inespecífica do ensaio. Os resultados foram plotados

em escala semilogarítmica, e observou-se para a separação com o 2º Anticorpo, que o valor B/T igual a 50% correspondeu à diluição 1:600.000, que correspondeu a um B/T de 32,5% na separação magnética.

3.3 - Radioimunoensaios

3.3.1 - Incubação

Inicialmente, a fase de primeira incubação seguia rigidamente a aconselhada pelo protocolo da Serono Diagnostics (74) para a separação em fase magnética, que consistia no uso do tampão fosfato de sódio, 0,05 M pH 7,4 (74) contendo 0,1% de soroalbumina bovina (03), 0,1% de azida sódica (03) e 0,01% de Tween 20 (59), tanto para as diluições do hormônio marcado e do 1º Anticorpo como nas várias diluições da curva padrão.

O tempo de incubação foi fixado em 24 horas, sempre a uma temperatura de 4°C, porém visando uma diminuição das ligações inespecíficas e conseqüentemente maior sensibilidade e precisão do ensaio, foram realizados testes, modificando-se a quantidade do antígeno marcado, temperatura, pH e molaridade do tampão fosfato de sódio (77) e o uso de soro equino livre de hTSH (logo após substituído pelo soro equino normal) para as diluições da curva padrão e das amostras controle, de ligação inespecífica (NSB) e de máxima ligação.

Em um segundo tempo foi utilizado o seguinte

protocolo de incubação que, de acordo com o parâmetro B_0/\sqrt{NSB} , proporcionou melhores resultados:

- quantidade de marcado: aproximadamente 25.000 cpm.
- diluição do 1º Anticorpo: 1:600.000.
- tampão utilizado: fosfato de sódio, 0,05 M, pH 7,4, 0,1% de soro albumina bovina, 0,1% de azida sódica e 0,01% de Tween 20.
- duração: 24 horas.
- temperatura ambiente.
- adição de soro equino livre de hTSH.

A curva padrão do hTSH, variou geralmente de 0,49 a 125 μ U/ml.

3.3.2 - Técnica de separação mediante o 2º Anticorpo em fase líquida

Para esta técnica de separação, foram adicionados 100 μ l do 2º Anticorpo já previamente diluídos no tampão fosfato de sódio, 0,05 M, pH 7,4, contendo 10% de EDTA e 1% de soro normal de coelho, exceto nos tubos para a determinação da radioatividade total. Após a agitação em "Vortex", iniciou-se a 2ª incubação com duração de 90 minutos, a temperatura ambiente. Passado este período, adicionaram-se 2 ml de água destilada e após uma perfeita homogeneização em "Vortex", os tubos foram centrifugados durante 20

minutos à 3.000 g a uma temperatura de 4°C. Concluída esta etapa, os tubos foram suavemente vertidos seguindo-se a determinação de suas radioatividades.

3.3.3 - Técnica de separação mediante o PEG 6000

As etapas de separação, seguiram praticamente a técnica original (16), usando-se 17% do Polietilenoglicol em tampão fosfato de sódio, 0,05 M, pH 7,4.

A cada amostra foram adicionados 500 µl desta solução que após homogeneização em "Vortex", foram centrifugadas à 3.000 g por 20 minutos a uma temperatura de 4°C. Concluída a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado lavado com 300 µl de uma solução de cloreto de sódio, 0,4 M. Após a lavagem, foram adicionadas mais 500 µl da solução de PEG e novamente os tubos foram centrifugados, à 3.000 g, por 30 minutos à mesma temperatura. Aspirou-se o sobrenadante e contou-se a radioatividade do precipitado de cada amostra.

3.3.4 - Técnica de separação em fase magnética

Nesta técnica, 500 µl de partículas magnéticas contendo um 2º anticorpo contra as gamaglobulinas do primeiro, em quantidade (mg/tubo) já determinada, foram adicionadas às amostras previamente incubadas. Após delicada agitação, iniciou-se o período da 2ª incubação com duração de 25 minutos, agitando-se as amostras após os primeiros 5 mi-

nutos. Logo após, a estante com as amostras foi introduzida por 2 - 3 minutos na base magnética e o sobrenadante foi desprezado, vertendo-se o separador magnético. Feito isto, iniciou-se o processo de lavagem utilizando 1 ml de tampão fosfato de sódio, 0,05 M, pH 7,4, sem SAB e Tween 20 (59); novamente a estante foi introduzida na base do separador magnético, repetindo-se o processo para desprezar o sobrenadante. Logo após, os tubos foram colocados invertidos sobre uma folha de papel absorvente e após 5 minutos, determinou-se a radioatividade.

3.4 - Programa computacional

Os dados dos ensaios foram obtidos pelo programa RIAKALK, que emprega o modelo de ajustagem log-logito de quatro parâmetros (ligação total, ligação inespecífica, inclinação e ponto médio da curva), pelo método não linear dos mínimos quadrados com reponderação iterativa, compatibilizado ao sistema PC (08) utilizando um microsistema XT II da Itautec, São Paulo, Brasil.

O programa RIAKALK calcula um perfil de precisão (coeficiente de variação relativo à dose), baseado no percentual de erro de cada ponto da curva padrão ajustada (70).

Os demais gráficos e análise de regressão linear foram obtidos através de uma planilha de cálculos ASEASY.

3.5 - Método de preparação do 2º Anticorpo acoplado a celulose magnetizada

Segundo anticorpos (anti IgG de coelho produzidos em carneiro) importados, com diluição pré-estabelecida pelo fornecedor (RADIOASSAY) e produzidos no IPEN (09) com concentração 4 vezes maior que a utilizada no método de separação líquida, foram acoplados a partículas de média densidade, M-100 da Scipac Limited (celulose e óxido de ferro em iguais concentrações) e de baixa densidade M-104 também da Scipac Limited (celulose e óxido de ferro a uma concentração de 3:1, respectivamente).

A técnica de acoplamento utilizada foi a do metaperiodato de sódio, introduzindo algumas modificações no protocolo original da própria Scipac (73, 02).

O esquema de acoplamento por nós utilizado foi:

- Homogeneização da partícula original importada, por 30 minutos, a temperatura ambiente, com movimentos circulares, a uma velocidade de 30 rpm.
- Após a homogeneização 10 ml da suspensão dessas partículas foram postas em um recipiente de vidro, logo após colocado sobre um ímã permanente para a sedimentação das partículas.
- Desprezado o sobrenadante por aspiração, realizaram-se 2 lavagens do precipitado com água bi-distilada.

- Adicionaram-se a 10 ml de água bi-destilada, e após homogeneização, colocaram-se 2 g do agente oxidante, homogeneizado por movimentos circulares (30 rpm) a temperatura ambiente e em ausência de luz por 40 minutos.
- Lavou-se o precipitado 4 vezes com água bi-destilada.
- Adicionaram-se 10 ml de tampão bicarbonato de sódio, 0,1 M, pH 8,6 e rolou-se por 20 minutos a temperatura ambiente.
- Aspirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 10 ml do 2º Anticorpo previamente diluído em tampão fosfato de sódio, 0,05 M, pH 7,4 contendo 10% de EDTA e 1% de soro normal de coelho, rolou-se por 48 horas a 4°C.
- Aspirou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado 1 vez com o tampão bicarbonato de sódio.
- Aspirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 10 ml de uma solução formada por 45% do tampão bicarbonato de sódio, 45% de soro equino normal, mais 10% de etanolamina. Rolou-se por 2 horas a 4°C, visando a saturação dos sítios da celulose que não continham o 2º Anticorpo acoplado.
- Aspirou-se o sobrenadante e lavou-se 1 vez com tampão bicarbonato de sódio.

- Aspirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 10 ml de tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 4,0, rolando a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Aspirou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado 1 vez com tampão fosfato de sódio, 0,05 M, pH 7,4.
- Aspirou-se o sobrenadante e reconstituiu-se o volume original com tampão fosfato de sódio, 0,05 M, pH 7,4 contendo 0,1% de azida sódica.
- Estocou-se o produto final a 4°C.

No sentido de evitar-se perdas de partículas durante o acoplamento, todas as aspirações foram realizadas com pipetas tipo Pasteur e a homogeneização realizada com suaves agitações.

O rendimento do acoplamento, ou seja a quantidade final do produto obtido em relação ao peso original das partículas usadas, foi obtido determinando-se a massa das partículas, antes e depois do acoplamento, a partir de alíquotas de 50 µl, previamente lavadas, para retirar-se os sais presentes nos tampões e liofilizadas por um período de aproximadamente 16 horas.

3.6 - Construção de um separador magnético nacional

A partir do modelo do separador magnético R-217 da Scipac Limited (figura 2) que utiliza partículas de Samário Cobalto como geradoras do campo magnético, responsável pela

sedimentação da fase sólida na separação por fase magnética, foi construído um separador com produtos nacionais de fácil aquisição e de baixo custo (figura 3).

Este separador é formado por 5 barras de ferrite imantadas, com dimensões de 20 x 20 x 200 mm, montadas em um suporte de madeira. A estante móvel foi produzida com duas placas paralelas de acrílico com dimensões de 150 x 200 mm, contendo ambas 50 perfurações correspondentes, com 7 mm de diâmetro.

A fixação dos tubos durante o processo de inversão, foi obtida utilizando-se folhas de isopor de 10 mm de espessura entre as placas de acrílico, com orifícios de 5 mm de diâmetro.

3.7 - Método de análise dos resultados dos perfis de precisão

3.7.1 - Construção de perfis de precisão obtidos com "n" replicatas da curva padrão

Os conceitos e métodos de obtenção de perfis de precisão proposto por Ekins (29), foram aplicados a curvas padrão de radioimunoensaio de hTSH obtidas com o método de separação em fase magnética, utilizando partículas produzidas no IPEN e importadas da Scipac e com os métodos de separação em fase líquida do 2º Anticorpo e do Polietilenoglicol.

A curva padrão foi composta por 10 pontos

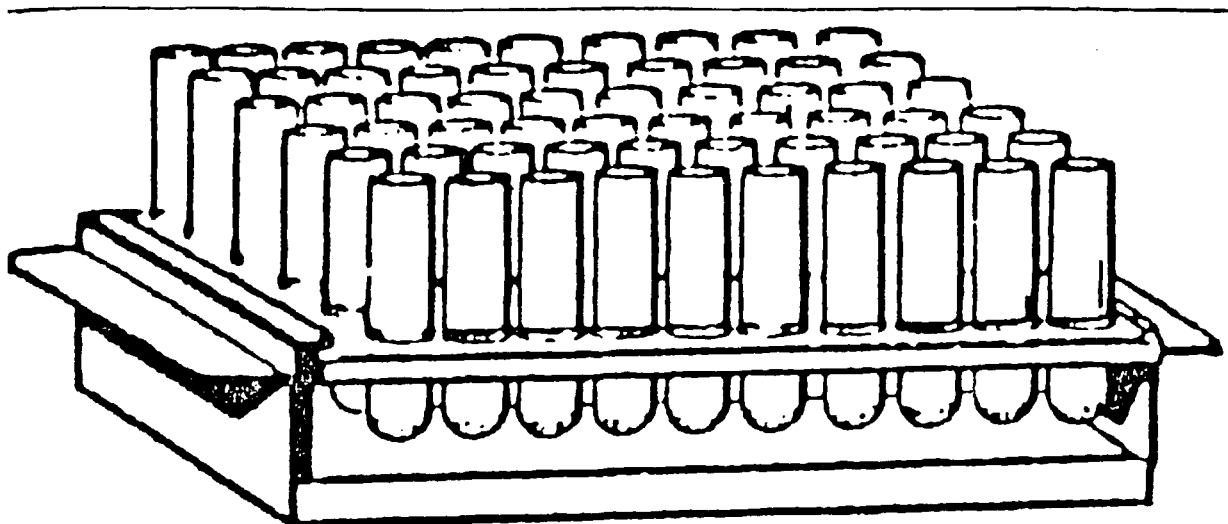


Figura 2: Separador magnético importado (SCIPAC, Limited, Londres).

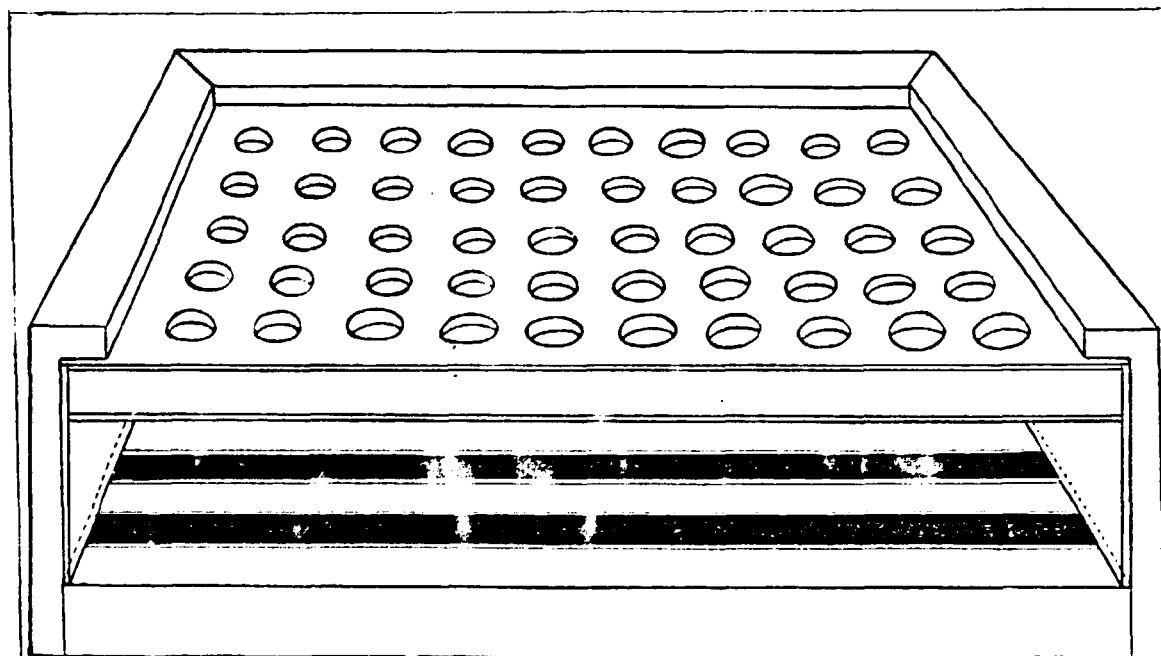


Figura 3: Separador magnético produzido no IPEN-CNEN/SP.

com 10 replicatas por ponto, visando a obtenção de 100 valores, que é considerado o número mínimo necessário para obter uma estatística satisfatória. Os valores dos pontos da curva variaram de 0,49 a 250 $\mu\text{U/ml}$.

O primeiro passo foi a obtenção da curva que relaciona a média das dez respostas ($\%B/T$) de cada ponto com a respectiva média dos desvios padrão (σ_R). Esta etapa é chamada por Ekins construção da Relação Erro-Resposta (RER).

O segundo foi a obtenção da curva dose ($\mu\text{U/ml}$) resposta ($\%B/T$) do ensaio, utilizando a média das 10 replicatas. A partir desta foram obtidos os valores da tangente e os $\%B/T$ relativos às doses 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{U/ml}$. Com estes valores, determinou-se, utilizando a equação da primeira curva (RER), o erro relativo à resposta (σ_R), que dividido pelo respectivo valor da tangente, forneceu o valor de erro relativo à dose (σ_D). O valor do coeficiente de variação destas doses foi obtido pela equação:

$$\%CV = \frac{\sigma_D}{\text{dose}} \times 100$$

Finalmente, foram obtidos os perfis de precisão, plotando-se em escala semilogarítmica o $\%CV$ versus as respectivas doses.

3.7.2 - Construção de perfis de precisão obtidos mediante duplicatas de "n" desconhecidos

Para este outro método de obtenção de perfis

de precisão, partiu-se novamente da obtenção de 100 valores por cada método de separação analisado, assim distribuídos:

- 9 pontos em duplicata da curva padrão no intervalo de 0,49 a 125 μ U/ml.
- 3 soros controle (baixo, médio e alto) em duplicata, obtidos pela diluição de um soro previamente liofilizado com elevada concentração de hTSH.
- 38 soros desconhecidos em duplicata de níveis baixo, médio e alto.

O "RER" foi construído analogamente ao caso anterior, plotando-se a média das respostas de cada duplicata de amostras versus o respectivo desvio padrão e dividindo o eixo das abscissas (%B/T) em regiões homogêneas. A equação da curva RER foi calculada a partir dos valores médios de cada região.

Na obtenção dos perfis de precisão, seguiram-se todos os passos da metodologia usada para "n" replicatas, descritos no item 3.7.1.

4 - RESULTADOS

4.1 - Controle de qualidade do separador magnético IPEN em comparação com o importado

4.1.1 - Comparação das curvas de radioimunoensaio

Neste ensaio comparativo entre o separador magnético produzido no IPEN e o importado (SCIPAC Limited, COD. 217), utilizou-se a partícula magnética DAMP-R da Sero-no Diagnostics em quantidade de 2 mg por tubo, previamente determinada.

O ensaio em quadruplicata, teve pontos da curva variando entre 1,95 e 125 μ U/ml de hTSH.

A análise das curvas (figuras 4 e 5) obtidas pelo programa computacional RIAKALK demonstrou a total identidade entre os ensaios, provando a homogeneidade e eficiência do separador produzido (Tabela I).

As médias das contagens relativas aos valores da ligação inespecífica, ligação total e cada ponto da curva padrão (n = 4 replicatas), obtidos com os dois separadores, foram comparadas pelo teste T de Student, não havendo diferença significativa para um p = 0,05 e 6 graus de liberdade (valor teórico de $T_{9,7,5} = 2,247$), como pode ser observado na Tabela II. [6]

TABELA I

PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ENSAIO, OBTIDOS NAS CURVAS DE RIE,
COM O SEPARADOR MAGNÉTICO PRODUZIDO NO IPEN E O IMPORTADO

VALORES	SEPARADOR IPEN	SEPARADOR IMPORTADO
NSB (%)	2,13	2,11
B ₀ (%)	40,27	40,30
ED ₂₀ (μU/ml)	42,66	42,74
ED ₅₀ (μU/ml)	11,22	11,34
ED ₈₀ (μU/ml)	2,95	3,01
DOSE MÍNIMA DETECTADA (DMD) (μU/ml)	1,35	1,38
ERRO RELATIVO A DMD (%)	6,80	6,05

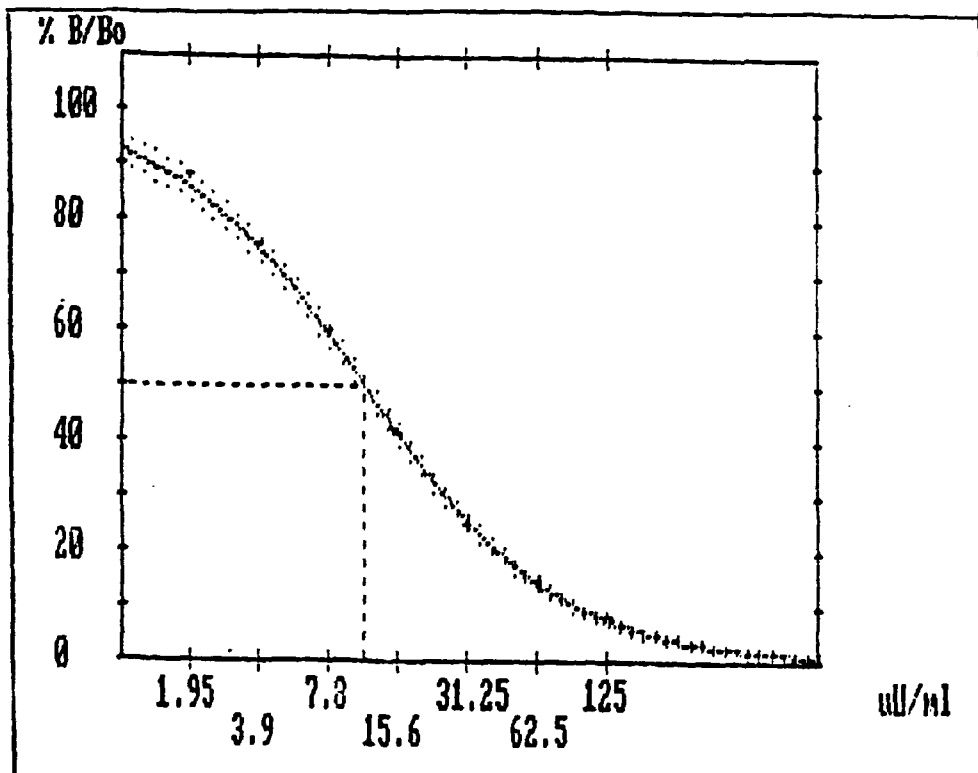


Figura 4: Curva padrão obtida com o programa computacional RIAKALK, de um ensaio de hTSH, utilizando o separador magnético produzido no IPEN-CNEN/SP.

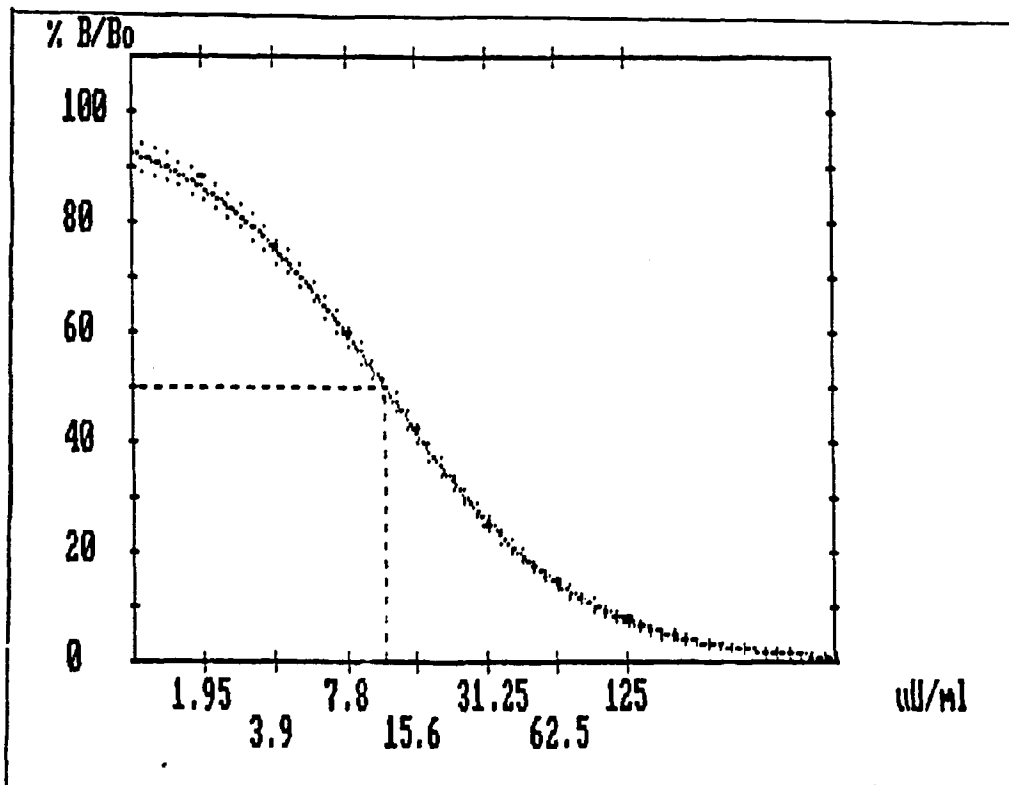


Figura 5: Curva padrão obtida com o programa computacional RIAKALK, de um ensaio de hTSH, utilizando o separador magnético importado (SCIPAC).

TABELA II

VALORES CALCULADOS DE T PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS (EM CPM), OBTIDOS COM O SEPARADOR MAGNÉTICO PRODUZIDO NO IPEN E O IMPORTADO

VALORES	SEPARADOR IPEN		SEPARADOR IMPORTADO		T CALCULADO
	\bar{X} CPM	DP	X CPM	DP	
NSB	130	8	129	10	0.2373
B ₀	2.542	68	2.546	69	0.0772
1,95 μ U/ml	2.257	58	2.264	62	0.1644
3,90 μ U/ml	1.953	46	1.960	53	0.1849
7,80 μ U/ml	1.575	40	1.574	42	0.0341
15,60 μ U/ml	1.146	30	1.154	31	0.3709
31,25 μ U/ml	732	19	740	20	0.5761
62,50 μ U/ml	489	13	493	14	0.4193
125,00 μ U/ml	337	9	332	9	0.8041

4.1.2 - Comparação dos perfis de precisão

Os perfis de precisão de ambos os ensaios obtidos com quadruplicata de cada ponto da curva padrão, podem ser observados nas figuras 6 e 7, (aceita-se, geralmente, um percentual de erro inferior a 10%).

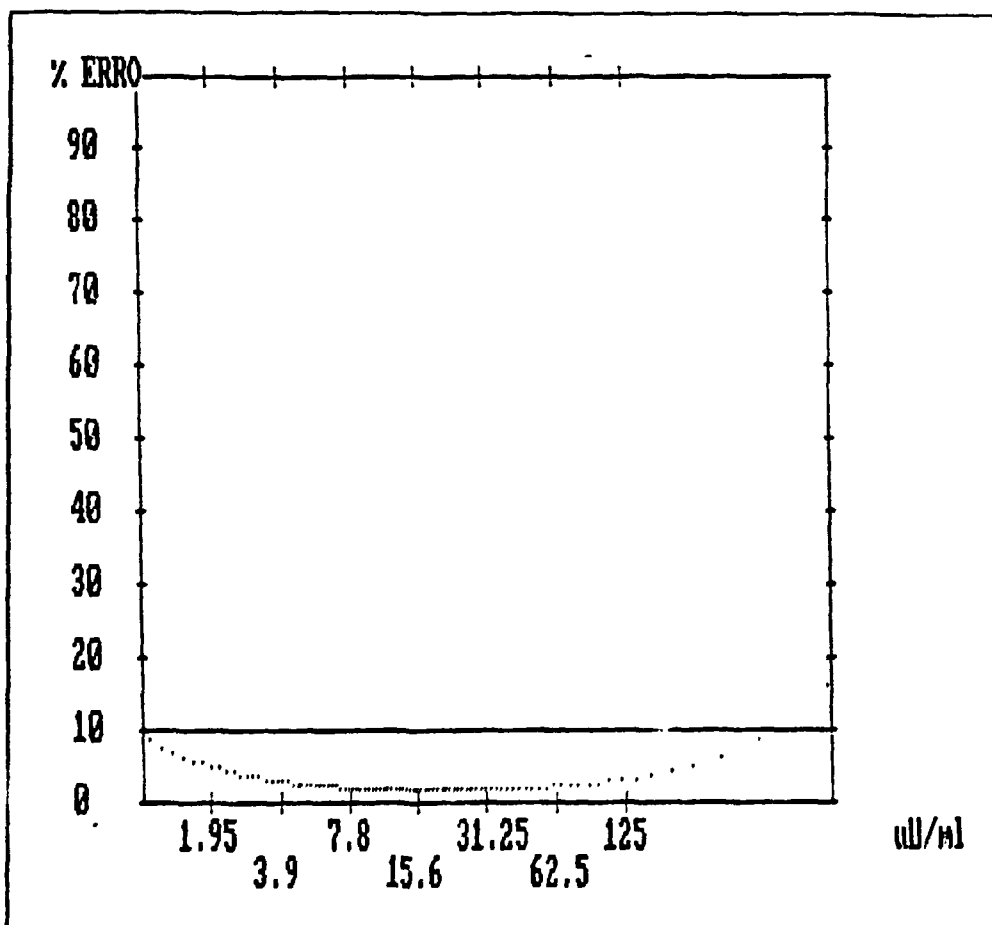


Figura 6: Perfil da precisão obtido com o programa computacional RIAKALK, de um ensaio de HTSH, utilizando o separador magnético produzido no IPEN-CNEN/SP

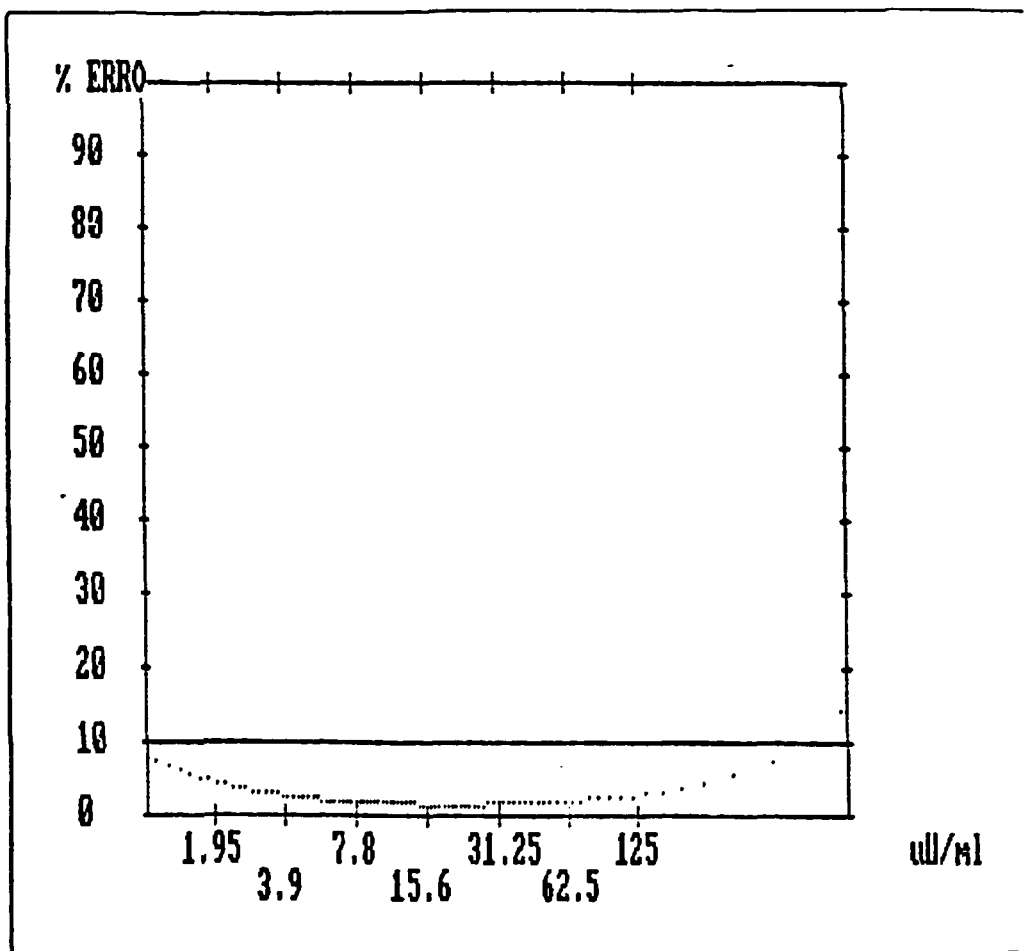


Figura 7: Perfil de precisão obtido com o programa computacional RIAKALK, de um ensaio de hTSH, utilizando o separador magnético importado (SCIPAC).

Podemos observar uma grande semelhança entre ambos os perfis, apesar da maior precisão entre as doses com concentrações 15,60 e 31,25 U/ml, obtida com o separador importado, porém essa pequena diferença pode não ser significativa devido à limitada estatística considerada.

4.2 - Preparação e controle de qualidade das partículas magnéticas preparadas no IPEN

4.2.1 - Padronização da técnica de acoplamento com o metaperiodato de sódio

Nesta etapa do trabalho, foram realizadas várias modificações no acoplamento, à partir do protocolo original proposto pela SCIPAC. Dois tipos de partículas e de 2º Anticorpos foram utilizados, além de variações na metodologia de incubação, visando a obtenção da melhor qualidade de ensaio. A este respeito foram considerados especialmente os resultados das ligações inespecíficas e específicas obtidos com cada partícula produzida.

4.2.1.1 - Resultados do acoplamento com o protocolo original

Neste primeiro acoplamento foram utilizados 5 ml (250 mg) da partícula M 100 da SCIPAC, de média densidade (50% de Fe_3O_4 e 50% de celulose) 1,25 ml do 2º Anticorpo da Radioassay em concentração original.

Os resultados do NSB e B_0 relativos a esta partícula em comparação com a DAMP-R da Serono, ambas com quantidades de 2 mg por tubo, são apresentados na tabela III.

Observou-se que a partícula magnética produzida no IPEN, provavelmente não teve todos os sítios de ligação saturados com a adição de Etanolamina a 0,3% de acordo com o protocolo de acoplamento proposto pela

própria SCIPAC. Com isto a fração marcada (*Ag) se acoplou à celulose, durante o processo de separação do ensaio, produzindo o elevado valor do NSB. Também o valor de B_0 foi bastante inferior àquele obtido pelo DAMP-R, talvez por insuficiente acoplamento de 2º Anticorpo.

TABELA III

VALORES COMPARATIVOS DE NSB E B_0 , ENTRE A PARTÍCULA DAMP-R DA SERONO E A IPEN

VALORES	DAMP-R	PARTÍCULA IPEN
NSB (%)	3,7	7,9
B_0 (%)	29,1	19,1

4.2.1.2 - Modificação da concentração dos reagentes utilizados no acoplamento e do tipo de partícula

Neste acoplamento foram utilizados 10 ml do 2º Anticorpo com diluição de 1:4 em tampão Fosfato de sódio, 0,05 M pH 7,4, contendo 10% de EDTA e 1% de soro normal de coelho, que representam as condições normalmente usadas em nossos RIEs de fase líquida. Partiu-se originalmente de 10 ml de partículas M 104 da SCIPAC, de baixa densidade (25% de Fe_3O_4 e 75% de celulose) e dobrou-se a quantidade de Metaperiodato de sódio aumentando-se em 30 vezes a concentração da Etanolamina.

Os resultados obtidos com a quantidade de partículas igual a 2 mg por tubo são mostrados na tabela IV.

TABELA IV

VALORES DA LIGAÇÃO INESPECÍFICA E ESPECÍFICA, UTILIZANDO MAIORES QUANTIDADES DE METAPERIODATO DE SÓDIO E ETANOLAMINA

VALORES	PARTÍCULA IPEN
NSB (%)	18,6
B ₀ (%)	35,7

Observou-se que o percentual da ligação específica aumentou com as modificações introduzidas, possivelmente devido à maior quantidade de Metaperiodato de sódio usada. Porém, o percentual de ligação inespecífica apresentou-se muito elevado.

4.2.1.3 - Resultados do protocolo final de acoplamento

Visando a diminuição das ligações inespecíficas, utilizou-se soro equino normal na etapa de saturação dos sítios de ligação da celulose, que não foram totalmente ocupados pelo 2º Anticorpo durante o acoplamento. Este soro diluído a 50% em tampão Bicarbonato de sódio, 0,1 M,

pH 8,6 contendo 10% de Etanolamina, foi adicionado em volume igual ao das partículas magnéticas utilizadas.

Os resultados deste acoplamento, variando-se as quantidades das partículas por tubo utilizadas no ensaio, são mostrados na tabela V.

TABELA V

VALORES DE NSB E B_0 , OBTIDOS COM O MÉTODO FINAL DE ACOPLAMENTO

QUANTIDADES EM mg POR TUBO	0,25	0,50	1,00	2,00
NSB (%)	1,70	3,60	3,00	3,10
B_0 (%)	6,50	11,50	22,20	34,30

Observou-se com essa modificação, com relação aos resultados anteriores, uma diminuição do valor da ligação inespecífica, indispensável para uma precisão satisfatória, juntamente com a obtenção de um valor aceitável de ligação específica, a partir da quantidade de 1,00 mg de partícula por tubo.

4.2.1.4 - Acoplamento com o 2º Anticorpo produzido no IPEN

Nos acoplamentos até então realizados,

foi usado o 2º Anticorpo da Radioassay. Com a produção no IPEN do 2º Anticorpo (carneiro-anti-coelho), passou-se a utilizar este produto em novos acoplamentos. Os testes iniciaram-se com o cálculo da ótima diluição desse 2º Anticorpo, quando usado para a separação do RIE em fase líquida. Os resultados são mostrados na tabela VI.

TABELA VI

VALORES DE NSB E B_0 , COM VÁRIAS DILUIÇÕES DO 2º ANTICORPO IPEN, NA SEPARAÇÃO EM FASE LÍQUIDA

VALORES	2º ANTICORPO IPEN					RADIO-ASSAY
DILUIÇÕES	1:2,5	1:5,0	1:10,0	1:15,0	1:20,0	1:4,0
NSB (%)	0,9	2,2	2,6	2,6	1,7	1,2
B_0 (%)	6,0	9,6	16,4	18,3	23,8	23,6

Estes valores comprovam o maior título do 2º Anticorpo produzido no IPEN em relação ao similar importado.

A seguir foram realizados acoplamentos, variando-se a diluição do 2º Anticorpo IPEN adicionando sempre em volume igual àquele original das partículas. No ensaio, visando-se a diminuição do NSB, foram introduzidas as seguintes modificações:

- a) incubação a temperatura ambiente;
- b) adição de 100 μ l de soro equino normal,

em substituição do tampão ensaio, em cada ponto da curva padrão.

Os resultados obtidos após a introdução, na técnica de acoplamento e nos ensaios, das modificações supracitadas, são mostrados na tabela VII.

TABELA VII

VALORES DE NSB E B_0 , RELATIVOS À PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PREPARADAS COM O 2º ANTICORPO IPEN E SUA COMPARAÇÃO COM A PARTÍCULA PRODUZIDA COM O 2º ANTICORPO IMPORTADO (QUANTIDADE DE PARTÍCULAS = 1 mg POR TUBO)

VALORES	2º ANTICORPO IPEN				2º ANTICORPO RADIOASSAY
	1:2,0	1:5,0	1:10,0	1:20,0	1:4,0
DILUIÇÃO	1:2,0	1:5,0	1:10,0	1:20,0	1:4,0
NSB (%)	1,6	1,6	0,7	0,6	0,9
B_0 (%)	55,0	52,3	14,4	12,7	36,7

Com esses dados, estipulou-se que, a diluição do 2º Anticorpo produzido no IPEN, utilizado no acoplamento, deveria ser aproximadamente 4 vezes menor (1:5) que sua diluição empregada na separação em fase líquida (1:20).

4.2.1.5 - Acoplamento com a partícula magnética M 100

A mesma diluição do 2º Anticorpo IPEN, foi utilizada para o acoplamento com partículas de média densidade, (M 100), anteriormente testadas sem resultados positivos.

Os valores das ligações inespecíficas e específicas e a sua comparação com o nosso acoplamento de referência (2º Anticorpo da Radioassay e partículas de baixa densidade) são mostrados na tabela VIII.

TABELA VIII

VALORES DE NSB E B_0 COM PARTÍCULAS IPEN DE MÉDIA DENSIDADE COM O 2º ANTICORPO IPEN E SUA COMPARAÇÃO COM AS DE BAIXA DENSIDADE, ACOPLADAS AO 2º ANTICORPO IMPORTADO (QUANTIDADE DE PARTÍCULAS = 1 mg POR TUBO)

VALORES	2º ANTICORPO IPEN PARTÍCULAS DE MÉDIA DENSIDADE	2º ANTICORPO RADIOASSAY PARTÍCULAS DE BAIXA DENSIDADE
NSB (%)	0,9	1,2
B_0 (%)	33,6	31,5

Observa-se com estes valores, que foram obtidos resultados análogos ou melhores com o 2º Anticorpo IPEN, mesmo utilizando partículas com média densidade. Isto confirma definitivamente a qualidade do anticorpo IPEN e das novas condições de realização do acoplamento e ensaio.

4.2.1.6 - Variação do tempo de separação

Neste teste, variou-se o tempo de incubação da partícula magnética na etapa de separação do ensaio, para observar se esta alteração acarretaria um maior valor de li-

gação específica. Os resultados são mostrados na tabela IX.

TABELA IX

VALORES DE NSB E B_0 DE UM ENSAIO DE HTSH EM FASE MAGNÉTICA, VARIANDO-SE O TEMPO DE INCUBAÇÃO DAS PARTÍCULAS E SUA COMPARAÇÃO COM UMA SIMILAR IMPORTADA, (QUANTIDADE DE PARTÍCULAS = 2 mg POR TUBO)

VALORES	PARTÍCULAS IPEN		PARTÍCULAS SCIPAC	
TEMPO (min.)	25,0	90,0	25,0	90,0
NSB (%)	1,3	1,3	0,8	0,6
B_0 (%)	24,6	23,4	25,5	24,8

Estes dados demonstram que o tempo de 25 minutos é o suficiente para que ocorram as ligações entre a partícula magnética e a fração ligada ao 1º Anticorpo.

4.2.2 - Rendimento do acoplamento

O rendimento do acoplamento, ou seja a quantidade (massa) de partículas magnéticas presentes no produto final em relação a quantidade inicial usada, foi determinada rotineiramente, para detectar perdas que inicialmente, eram de até 60%. Com isto descobrimos que a homogeneização das partículas com agitador tipo "VORTEX", durante os processos de lavagem e a aspiração do sobrenadante com

bomba de vácuo, eram os principais responsáveis pelas perdas existentes (tabela X). Em novos acoplamentos, realizaram-se homogeneizações manuais e aspirou-se o sobrenadante com pipetas tipo "PASTEUR", quando foram observadas, geralmente, perdas de aproximadamente 20% sobre a quantidade de material original.

TABELA X

RENDIMENTO OBTIDO APÓS OS CUIDADOS
TÉCNICOS INTRODUZIDOS

ETAPA	DESCRIÇÃO	MASSA DE PARTÍCULAS (mg)	RECUPERAÇÃO (%)
1ª	Material original	288	100
2ª	Após rotação de 40 minutos com o Me-taperiodato de Sódio.	235	81
3ª	Após rotação de 48 horas com o 2º Anticorpo.	184	65
4ª	Após rotação de 2 horas com soro equino normal e Etanolamina.	194	69
5ª	Partícula pronta	214	77

4.2.3 - Estabilidade das partículas

Os dados deste estudo, são apresentados na tabela XI. Nela podemos observar que além do período de tempo relativo ao acoplamento, foi também levado em consideração o tempo de marcação do hormônio (hTSH).

Foi então observado que as partículas IPEN, são aparentemente menos estáveis que a partícula importada, pois perderam, apesar do hormônio recentemente marcado, aproximadamente 35 a 40% do valor da ligação específica em torno de 50 dias após o acoplamento. Porém, a consequente diminuição do valor da ligação inespecífica, manteve ou melhorou o seu desempenho no ensaio.

As partículas SCIPAC, além de mais estáveis, mantêm ou melhoram o desempenho, sem a diminuição do valor de ligações específicas.

O marcado de 1 mês reduziu o desempenho de todas as partículas indiscriminadamente, IPEN e SCIPAC e, finalmente, o uso de uma maior diluição do 2º Anticorpo, no acoplamento, (1:4 contra 1:2), além de proporcionar maior economia, conduziu a melhores resultados.

TABELA XI

ESTUDO DA ESTABILIDADE DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS ACOPLADAS COM O 29 ANTICORPO E SUA COMPARAÇÃO COM A SIMILAR IMPORTADA

PERÍODO DE TEMPO DO ACOPLAMENTO (DIAS) *	PERÍODO DE TEMPO DA MARCAÇÃO (DIAS)	PARTÍCULA IPEN A (diluição Ac 1:4)				PARTÍCULA IPEN B (diluição Ac 1:2)				PARTÍCULA SCIPAC			
		B ₀	% B ₀ INICIAL	NSB	B ₀ /√NSB	B ₀	% B ₀ INICIAL	NSB	B ₀ /√NSB	B ₀	% B ₀ INICIAL	NSB	B ₀ /√NSB
0	0	40,1	100,0	1,8	29,9	37,3	100,0	1,8	27,8	37,8	100,0	0,37	62,1
23	27	21,1	52,6	0,6	27,2	18,6	49,9	1,3	16,3	22,9	60,6	0,38	24,7
48	1	22,4	55,9	0,5	31,7	24,6	65,9	0,6	31,7	38,5	101,8	0,31	69,1

(*) PARTÍCULA IPEN

4.3 - Radioimunoensaio de hTSH

Foram realizados ensaios comparativos, com pontos em duplicata, utilizando a metodologia de separação em fase líquida, com o 2º Anticorpo IPEN (diluição de 1:20) e com o polietilenoglicol a 17%, e a separação por fase magnética com partículas importadas (DAMP-R da Serono Diagnostics) e produzidas no IPEN (quantidades de 2,0 e 1,5 mg por tubo, respectivamente).

Os resultados a partir das curvas padrão e os respectivos perfis de precisão (figuras 8 a 15) obtidos pelo programa computacional RIAKALK, admitindo-se um percentual de erro menor que 10%, serão mostrados na tabela XII. Lembremos que o cálculo dos perfis de precisão realizado pelo programa RIAKALK não utiliza o esquema estatístico descrito por EKINS (29), mas um ajuste baseado no modelo log-logito de 4 parâmetros.

Os valores de ligações inespecíficas claramente inferiores para os métodos em fase magnética, talvez tenham sido responsáveis pelos maiores intervalos de determinação útil dos perfis de precisão. A maior sensibilidade fornecida pela partícula IPEN, foi provavelmente causada pela maior precisão nas doses baixas apresentada por esta técnica. Uma tendência de qualidade inferior, parece estar relacionada à técnica de separação com o PEG 6000. Este tipo de análise, porém, ao nosso ver, não forneceu conclusões relevantes quando ao melhor método de separação usado, especialmente devido à baixa estatística utilizada: curvas padrão realizadas em duplicatas.

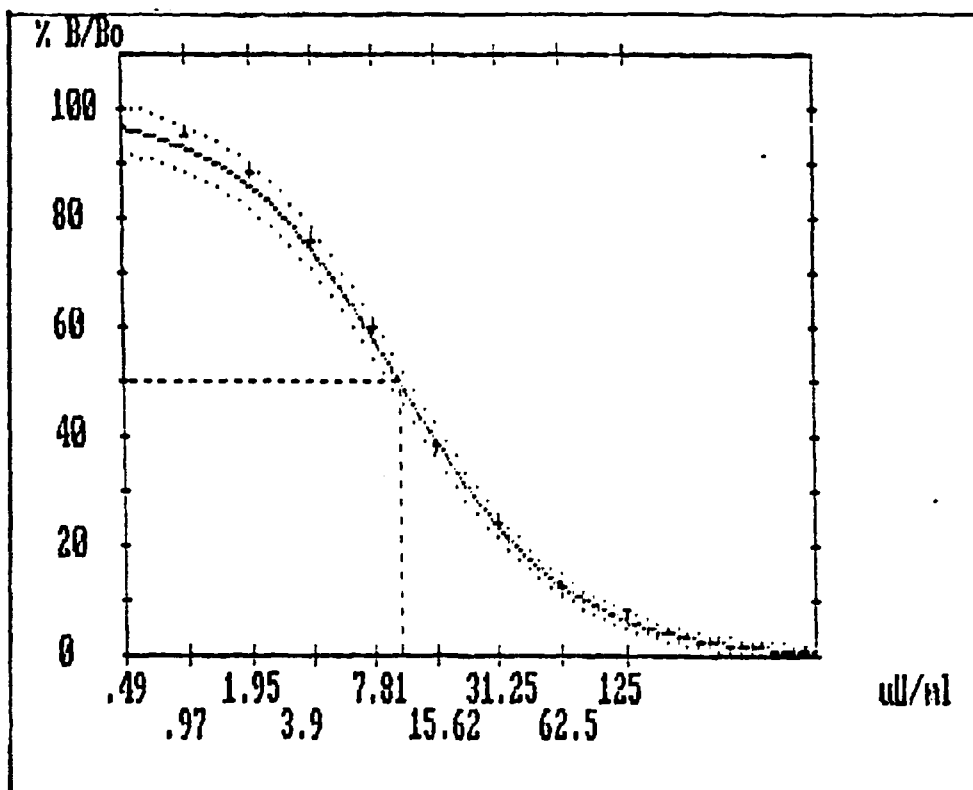


Figura 8: Curva padrão do ensaio de hTSH, utilizando o 2º Anticorpo IPEN como método de separação, obtida pelo programa computacional RIAKALK. (amostras em duplicata).

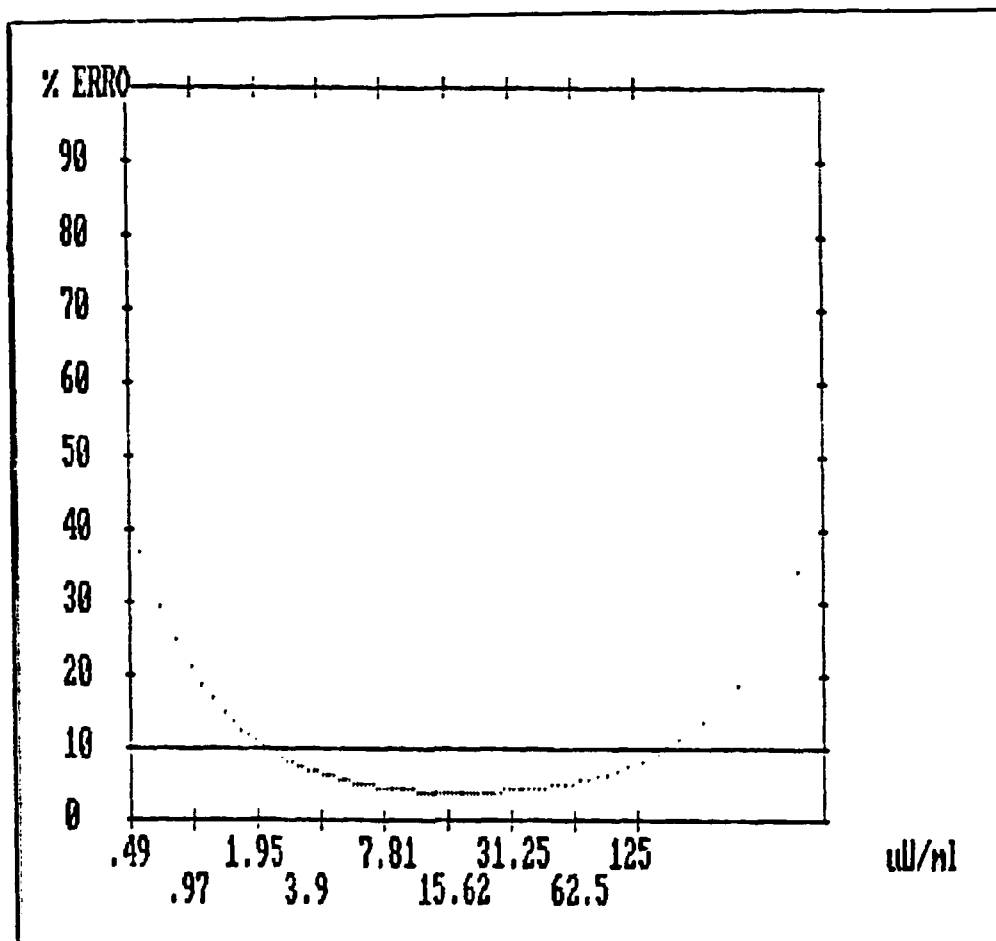


Figura 9: Perfil de precisão, obtido pelo programa RIAKALK, do ensaio de hTSH separado com o 2º Anticorpo IPEN.

(amostras em duplicata).

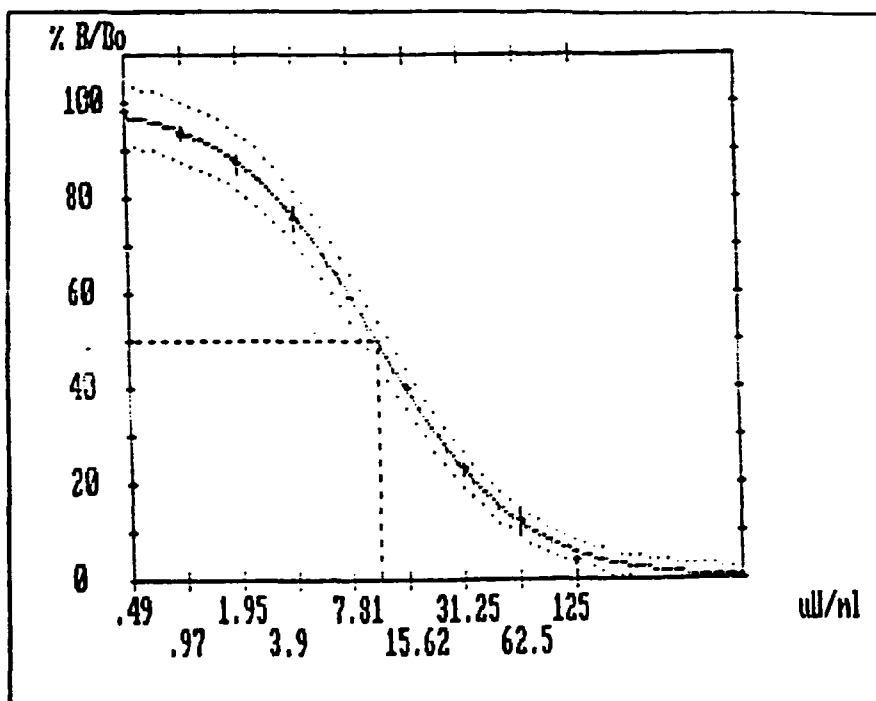


Figura 10: Curva padrão do ensaio de hTSH, utilizando o PEG como método de separação, obtida pelo programa computacional RIAKALK. (amostras em duplicata).

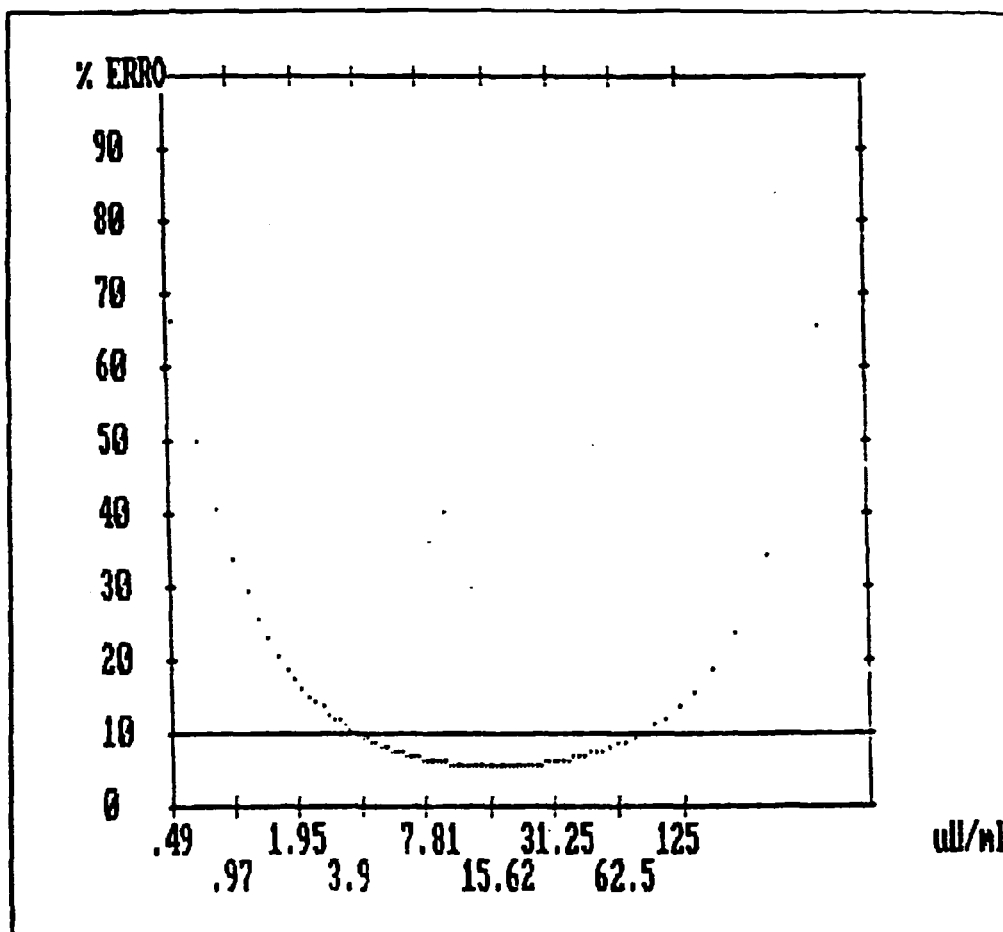


Figura 11: Perfil de precisão, obtido pelo programa RIAKALK, do ensaio de hTSH separado com o PEG. (amostras em duplicata).

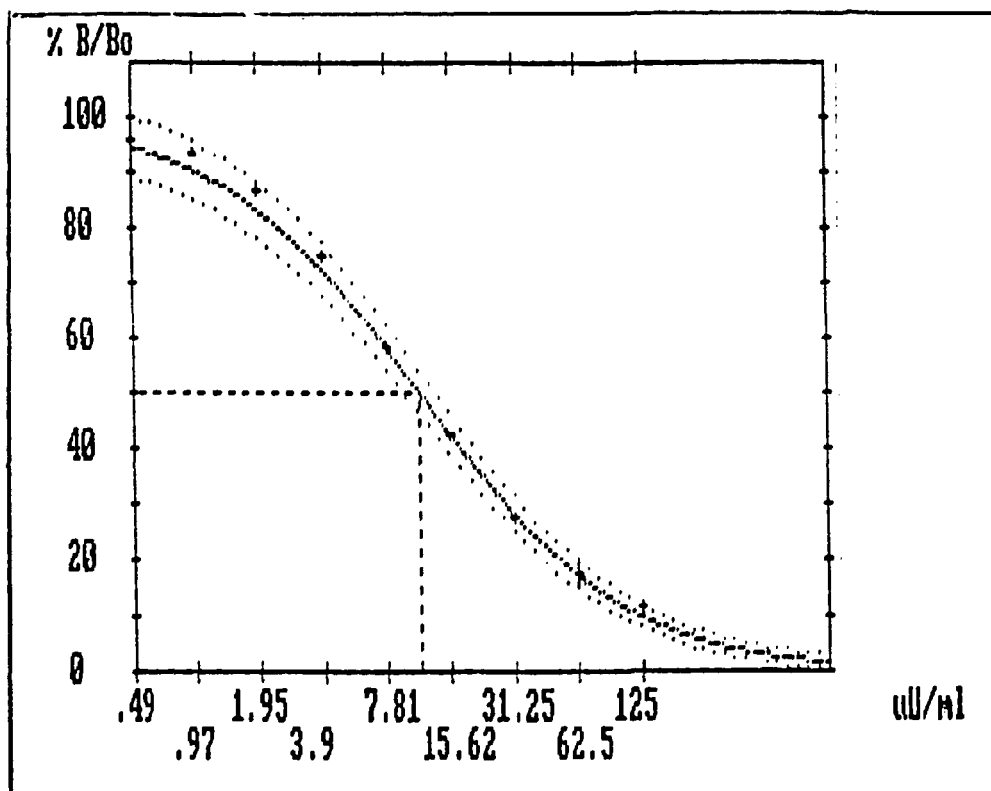


Figura 12: Curva padrão do ensaio de hTSH, utilizando a partícula DAMP-R da Serono Diagnostics, obtida pelo programa computacional RIAKALK.

(amostras em duplicata).

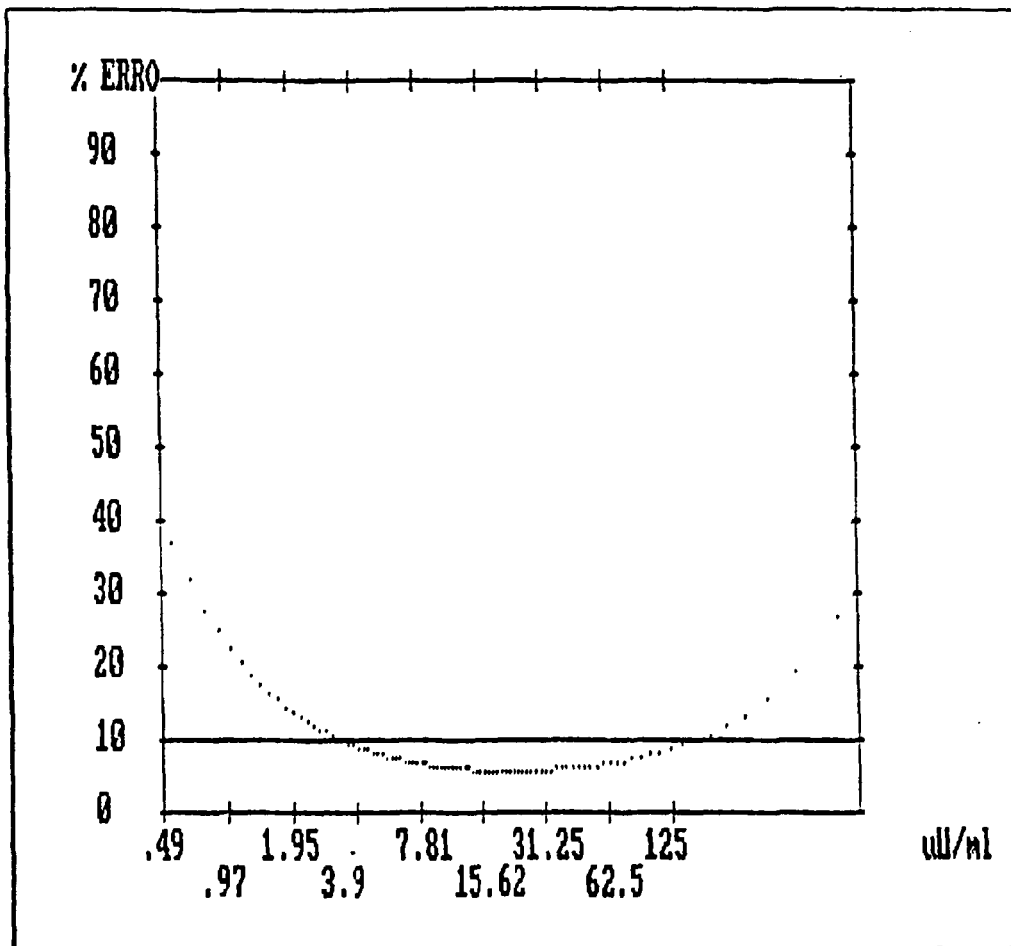


Figura 13: Perfil de precisão, obtido pelo programa computacional RIAKALK do ensaio de hTSH, separado com a partícula DAMP-R da Serono Diagnostics. (amostras em duplicata).

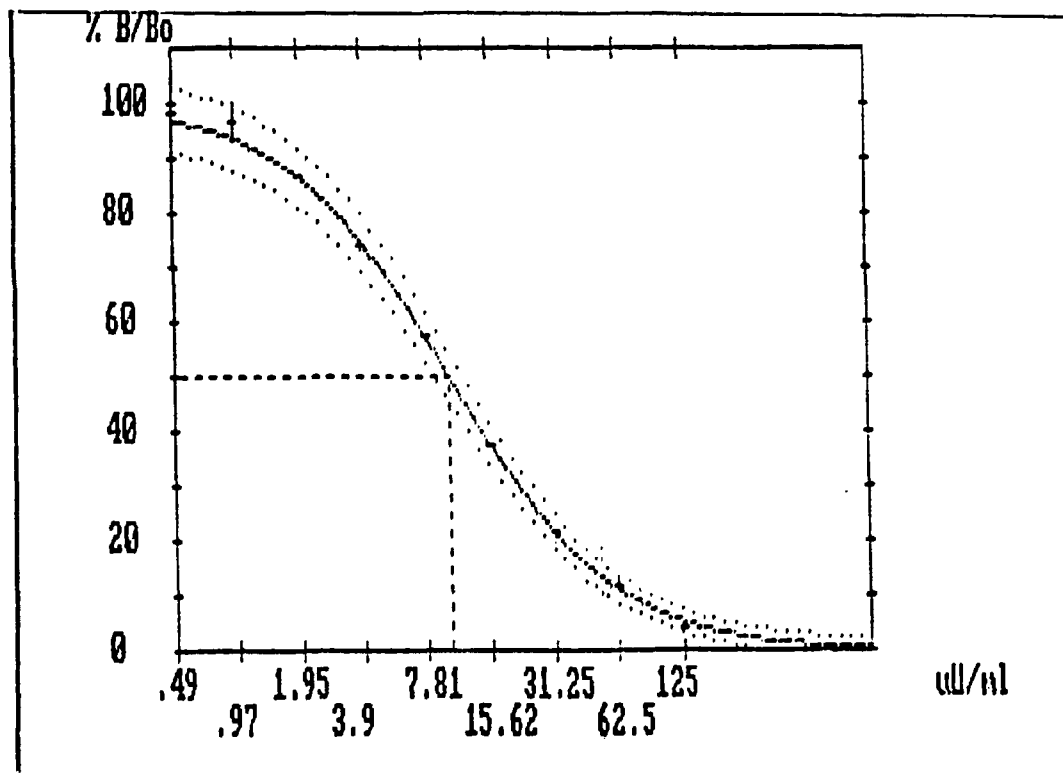


Figura: 14: Curva padrão do ensaio de hTSH, utilizando a partícula IPEN, obtida pelo programa computacional RIAKALK.

(amostras em duplicata).

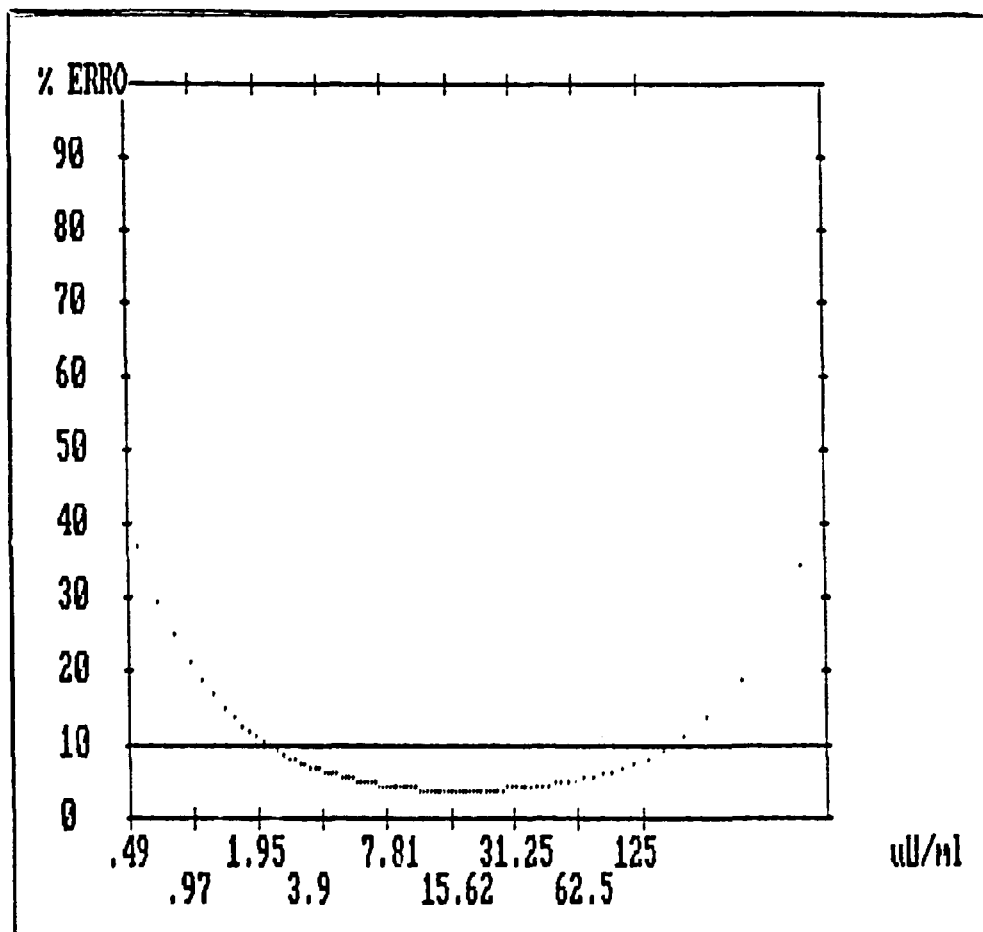


Figura 15: Perfil de precisão, obtido pelo programa computacional RIAKALK, do ensaio de hTSH, separado com a partícula IPEN. (amostras em duplicata).

TABELA XII

PARÂMETROS DE QUALIDADE DAS QUATRO FORMAS DE SEPARAÇÃO, DETERMINADOS PELO PROGRAMA COMPUTACIONAL RIAKALK, ANALIZANDO CURVAS REALIZADAS COM DUPLICATA DE CADA PONTO

VALORES	SEPARAÇÕES			
	2º AC	PEG	DAMP-R	IPEN
NSB (%)	4,50	5,46	1,28	1,36
B_0 (%)	51,38	50,36	31,03	28,64
B_0/\sqrt{NSB}	24,22	21,55	27,43	24,56
ED ₂₀ (µU/ml)	33,66	36,28	36,73	35,61
ED ₅₀ (µU/ml)	10,00	10,83	11,17	10,41
ED ₈₀ (µU/ml)	2,97	3,23	2,46	2,88
Soro controle baixo (µU/ml)	2,09	2,68	2,00	2,16
Soro controle médio (µU/ml)	6,36	6,88	8,07	7,54
Soro controle alto (µU/ml)	44,73	48,09	69,86	54,61
Inclinação da curva	1,14	1,18	0,92	1,08
Dose mínima detectada (µU/ml)	3,14	3,77	3,37	2,24
Erro relativo à DMD (%)	9,69	9,83	9,90	9,83
Intervalo determina- do no P.P. (µU/ml)	2,00-130,00	3,45-91,00	3,30-154,00	2,40-173,00
Erro mínimo nos P.P. (%)	4,00	6,10	6,10	3,80

4.4 - Análise dos perfis de precisão das quatro formas de separação

4.4.1 - Perfis obtidos mediante "n" replicatas da curva

Este primeiro esquema de cálculo dos perfis de precisão, foi realizado como aconselhado por EKINS (29). Os quatro sistemas diferentes de separação, foram realizados, cada um, com 10 replicatas da curva no intra-ensaio.

4.4.1.1 - Dados para a obtenção do perfil de precisão do ensaio separado com a partícula IPEN

A partícula IPEN utilizada nesta separação foi produzida a partir do 2º Anticorpo IPEN, com diluição de 1:2,5 acoplado à partícula magnética M 100 da SCIPAC, Limited, com uma quantidade de 1,5 mg por tubo.

Após a obtenção da curva padrão, foi calculada a média dos % B/T e o desvio padrão (σ_R) das replicatas de cada ponto da curva (tabela XIII) e construída a curva de relação erro-resposta (RER) (figura 16).

A correlação entre valores médios de B/T e os relativos valores médios de σ_R , calculados em intervalos de 5% de B/T, nos forneceu a equação utilizada no cálculo do coeficiente de variação de várias doses ao longo da curva.

TABELA XIII

VALORES MÉDIOS DO % B/T E SEUS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO, DAS 10 REPLICATAS DE CADA DOSE DA CURVA PADRÃO DE UM ENSAIO DE HTSH, SEPARADO COM A PARTÍCULA MAGNÉTICA IPEN.

INTERVALOS DE % B/T	% B/T	σ_R
0 - 5	1,92	0,16
5 - 10	6,89	0,18
10 - 15	13,79	0,37
15 - 20	19,57	0,90
20 - 25	24,31	0,46
25 - 30	27,86	0,53
30 - 35	30,23	0,52

A equação da reta calculada foi:

$$Y = 0,015 X + 0,177$$

$$r = 0,646$$

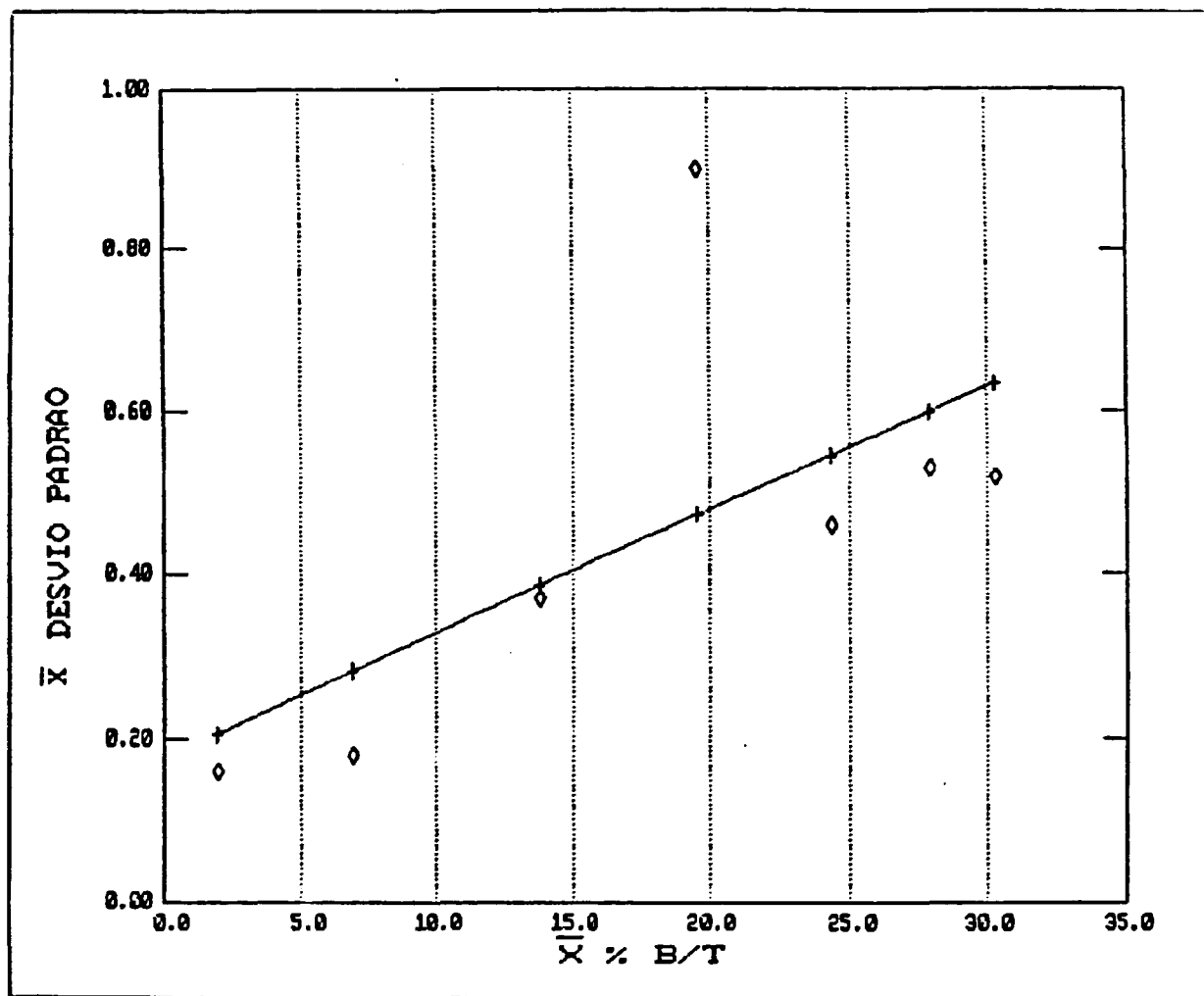


Figura 16: RER do ensaio de hTSH em decuplicata, separado com a partícula magnética IPEN.

Na tabela XIV são mostrados os valores de % B/T relativos à várias doses arbitrariamente escolhidas, ao longo da curva padrão. Por cada % B/T, foi calculado pela equação RER, o erro relativo a esta resposta (σ_R) e pela curva padrão, o valor da tangente de cada ponto da curva escolhido. O erro relativo à dose (σ_D), foi calculado pela razão σ_R/tg e o coeficiente de variação (CV), pela razão σ_D/Dose vezes 100.

TABELA XIV

VALORES TEÓRICOS OBTIDOS PARA A CONSTRUÇÃO DO PERFIL DE PRECISÃO (% CV x DOSE), DO ENSAIO DE hTSH, SEPARADO COM A PARTÍCULA MAGNÉTICA PRODUZIDA NO IPEN

DOSE ($\mu\text{U/ml}$)	% B/T	σ_R	Tg	σ_D	% CV
1,00	28,50	0,60	1,72	0,35	35,00
5,00	22,50	0,51	1,08	0,48	9,50
10,00	18,00	0,45	0,82	0,54	5,40
20,00	12,00	0,36	0,45	0,79	4,00
40,00	6,90	0,28	0,17	1,65	4,10
60,00	5,20	0,25	0,033	7,73	12,90
80,00	4,50	0,24	0,025	9,78	12,20
100,00	3,50	0,23	0,014	16,39	16,40

4.4.1.2 - Dados para a obtenção do perfil de precisão da separação com a partícula magnética importada

Nas tabelas XV e XVI e figura 17, são mostrados os dados obtidos para a construção do perfil de precisão de um ensaio de HTSH com partículas importadas (SCI-PAC, Limited) usadas em quantidade de 1 mg por tubo.

TABELA XV

VALORES MÉDIOS DO % B/T E SEUS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO, DAS 10 REPLICATAS DE CADA DOSE DA CURVA PADRÃO DE UM ENSAIO DE HTSH, SEPARADO COM A PARTÍCULA MAGNÉTICA IMPORTADA (SCIPAC, LIMITED)

INTERVALOS DE % B/T	$\bar{\% B/T}$	σ_R
0 - 5	2,27	0,17
5 - 10	5,55	0,24
10 - 15	14,74	1,23
20 - 25	20,66	0,81
25 - 30	26,60	0,75
30 - 35	32,30	0,50

A equação da reta calculada foi:

$$Y = 0,016 X + 0,359$$

$$r = 0,479$$

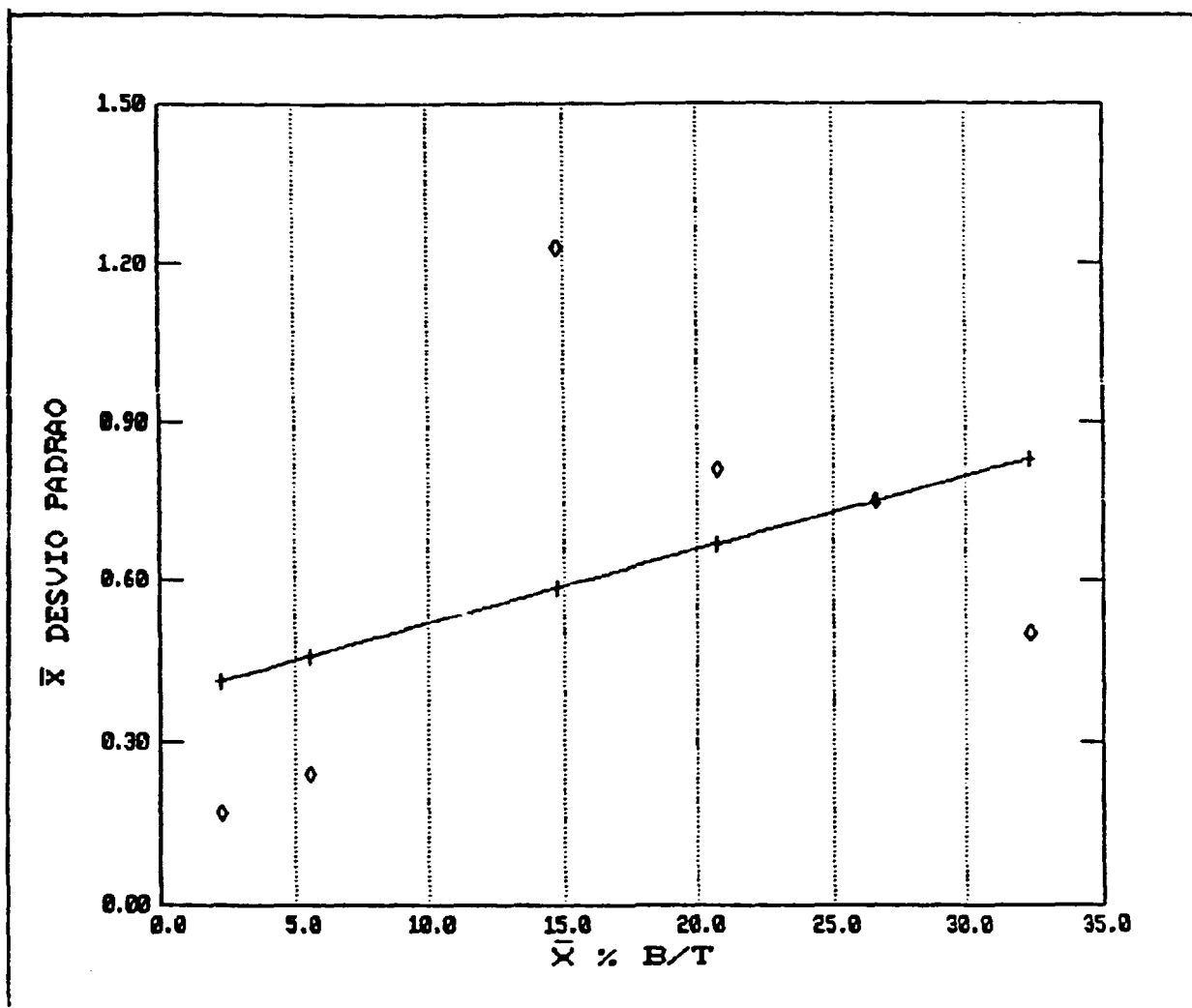


Figura 17: RER do ensaio de HTSH em decuplicata, separado com a partícula magnética importada (SCIPAC).

TABELA XVI.

VALORES TEÓRICOS PARA A CONSTRUÇÃO DO PERFIL DE PRECISÃO (% CV x DOSE) DO ENSAIO DE HTSH SEPARADO COM PARTÍCULAS IMPORTADAS.

DOSE (μ U/ml)	% B/T	σ_R	Tg	σ_D	% CV
1,00	32,00	0,87	1,62	0,54	54,00
5,00	25,50	0,77	1,37	0,56	11,20
10,00	20,00	0,68	1,00	0,68	6,80
20,00	12,50	0,56	0,52	1,07	5,40
40,00	7,20	0,47	0,13	3,65	9,10
60,00	6,00	0,45	0,05	9,10	15,20
80,00	5,00	0,44	0,04	10,97	13,70
100,00	4,20	0,43	0,026	16,40	16,40

4.4.1.3 - Dados para a obtenção do perfil de precisão da separação em fase líquida, usando o 2º Anticorpo IPEN

Nas tabelas XVII e XVIII e figura 18, são mostrados os dados obtidos para a construção do perfil de precisão, utilizando o 2º Anticorpo IPEN com diluição de 1:10, na separação do ensaio de HTSH em fase líquida.

TABELA XVII

VALORES MÉDIOS DE % B/T E SEUS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO,
DAS 10 REPLICATAS DE CADA DOSE DA CURVA DE UM ENSAIO DE HTSH,
SEPARADO COM O 2º ANTICORPO IPEN

INTERVALOS DE % B/T	$\bar{\% B/T}$	σ_R
0 - 5	2,81	0,27
5 - 10	6,25	0,60
10 - 15	14,06	0,50
20 - 25	21,62	0,56
25 - 30	26,83	1,59
35 - 40	37,54	1,22
40 - 45	42,84	1,70
45 - 50	46,59	2,79
50 - 55	50,09	1,10

A equação da reta calculada foi:

$$Y = 0,034 X + 0,197$$

$$r = 0,759$$

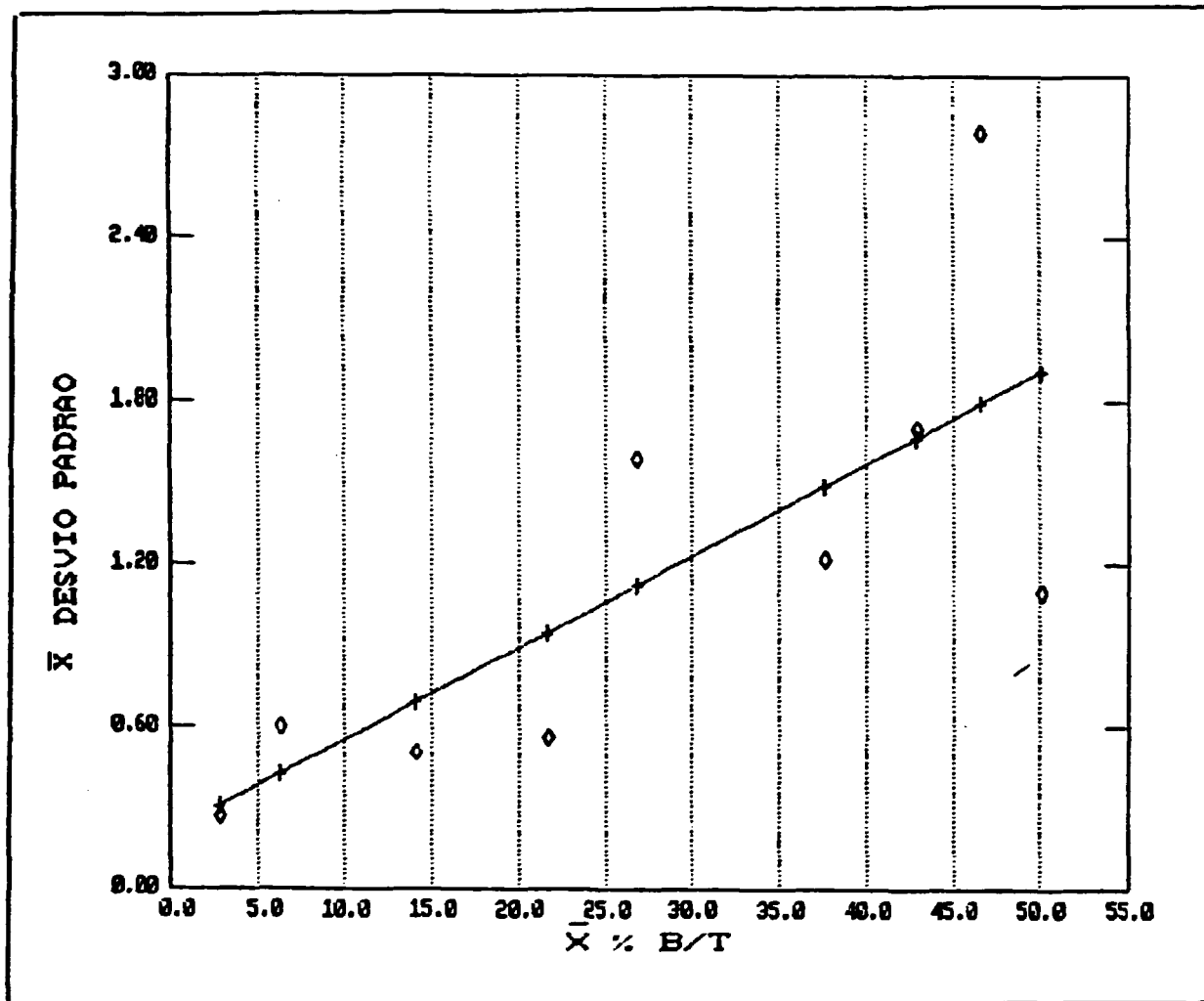


Figura 18: RER do ensaio de htsh, em decuplicata, separado com o 2º Anticorpo IPEN.

TABELA XVIII

VALORES TEÓRICOS OBTIDOS PARA A CONSTRUÇÃO DO PERFIL DE PRECISÃO (% CV x DOSE), DO ENSAIO DE hTSH, UTILIZANDO A SEPARAÇÃO COM O 2º ANTICORPO IPEN

DOSE (μ U/ml)	% B/T	σ_R	Tg	σ_D	% CV
1,00	47,00	1,79	4,91	0,37	37,00
5,00	35,00	1,39	2,35	0,59	4,80
10,00	16,80	0,77	1,31	0,59	5,90
20,00	18,00	0,81	0,67	1,21	6,70
40,00	9,00	0,50	0,24	2,10	5,20
60,00	6,70	0,42	0,055	7,72	12,90
80,00	6,50	0,42	0,026	16,08	20,10
100,00	6,00	0,40	0,021	19,10	19,10

4.4.1.4 - Dados para a obtenção do perfil de precisão do ensaio separado com o polietileno-glicol.

Os dados obtidos para a construção do perfil de precisão do ensaio de hTSH, utilizando o PEG a 17%, são mostrados nas tabelas XIX e XX e figura 19, a seguir.

TABELA XIX

VALORES MÉDIOS DO % B/T E SEUS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO,
 DAS 10 REPLICATAS DE CADA DOSE DA CURVA DE UM ENSAIO DE
 HTSH, SEPARADO COM O PEG A 17%

INTERVALOS DE % B/T	$\bar{\% B/T}$	$\bar{\sigma}_R$
0 - 5	1,32	0,40
5 - 10	5,36	0,83
10 - 15	10,96	1,07
15 - 20	18,67	0,70
25 - 30	28,23	0,71
35 - 40	37,45	0,69
40 - 45	43,24	0,89
45 - 50	46,74	0,57

A equação da reta calculada foi:

$$Y = 0,0001 X + 0,731$$

$$r = 0,007$$

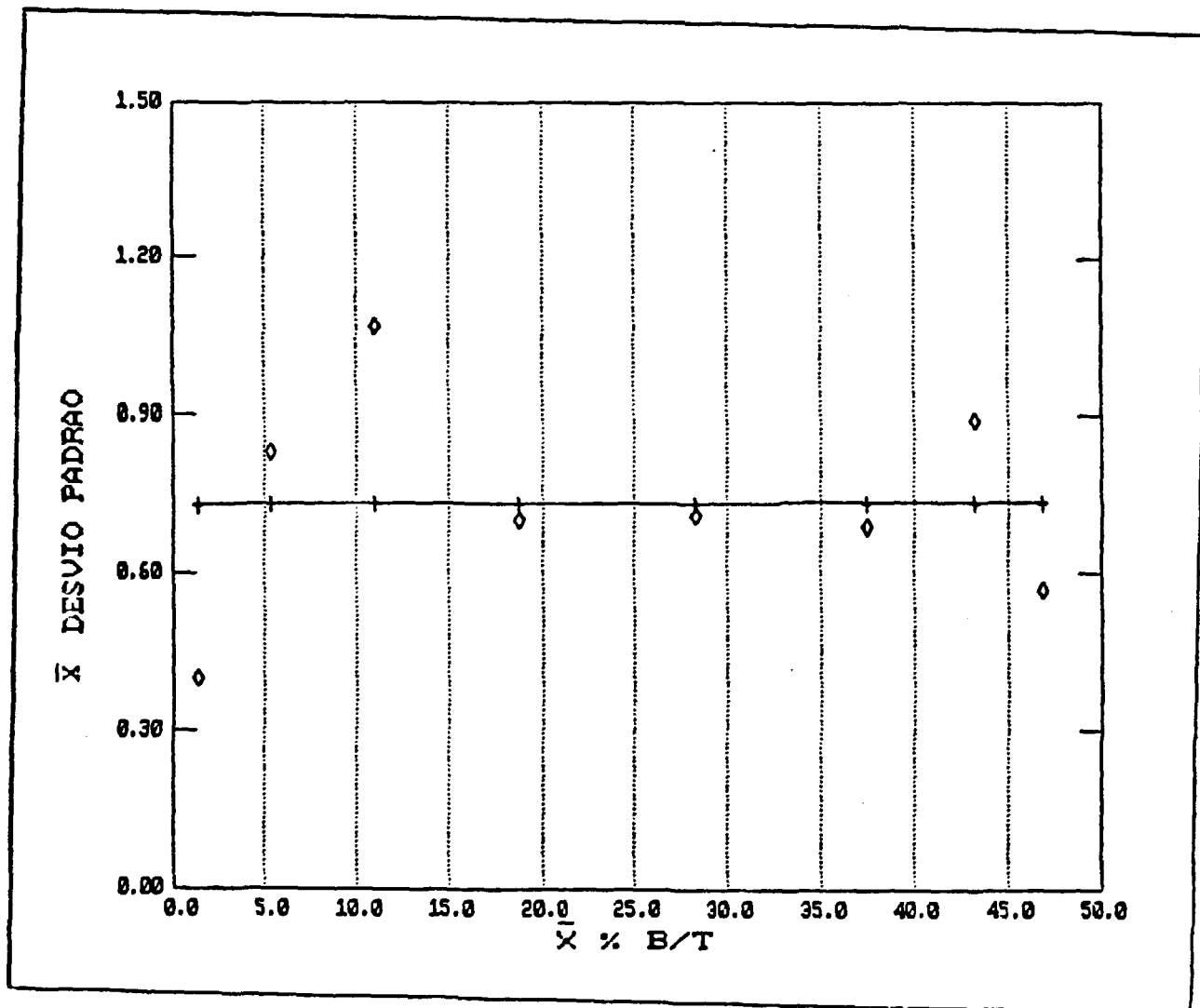


Figura 19: RER do ensaio de hTSH em decuplicata, separado com o Polietilenoglicol.

TABELA XX

VALORES TEÓRICOS OBTIDOS PARA A CONSTRUÇÃO DO PERFIL DE PRECISÃO (% CV x DOSE) DO ENSAIO DE hTSH, UTILIZANDO A SEPARAÇÃO COM O PEG A 17%.

DOSE ($\mu\text{U/ml}$)	% B/T	σ_R	Tg	σ_D	% CV
1,00	47,00	0,74	4,33	0,17	17,00
5,00	35,00	0,73	1,83	0,40	8,00
10,00	27,00	0,73	0,90	0,82	8,20
20,00	17,50	0,73	0,78	0,94	4,70
40,00	6,50	0,73	0,24	3,05	7,60
60,00	5,00	0,73	0,045	16,26	27,10
80,00	4,50	0,73	0,030	24,38	30,50
100,00	3,50	0,73	0,016	45,71	45,70

4.4.1.5 - Perfis de precisão

Nas figuras 20 a 23, são mostrados as respectivas curvas padrão dos quatro ensaios de hTSH, realizados com 10 replicatas de cada ponto da curva e separados mediante as quatro diferentes técnicas. Nas figuras 24 a 27, são apresentados os perfis de precisão calculados manualmente, enquanto nas figuras 28 a 31, são apresentados os perfis obtidos com o programa computacional RIAKALK e todos os dados obtidos são mostrados na tabela XXI.

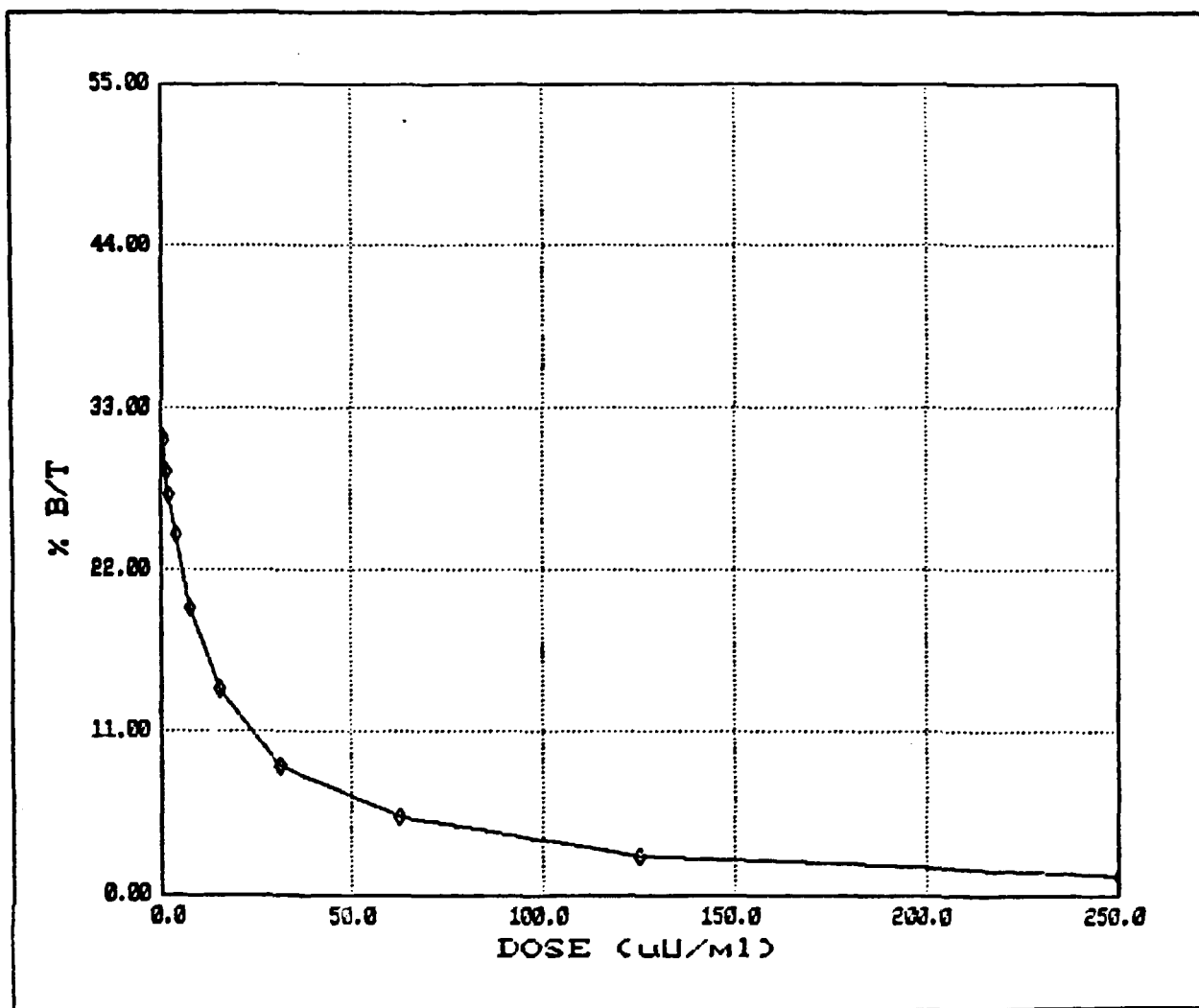


Figura 20: Curva padrão do ensaio de hTSH em decuplicata, separado com a partícula magnética IPEN.

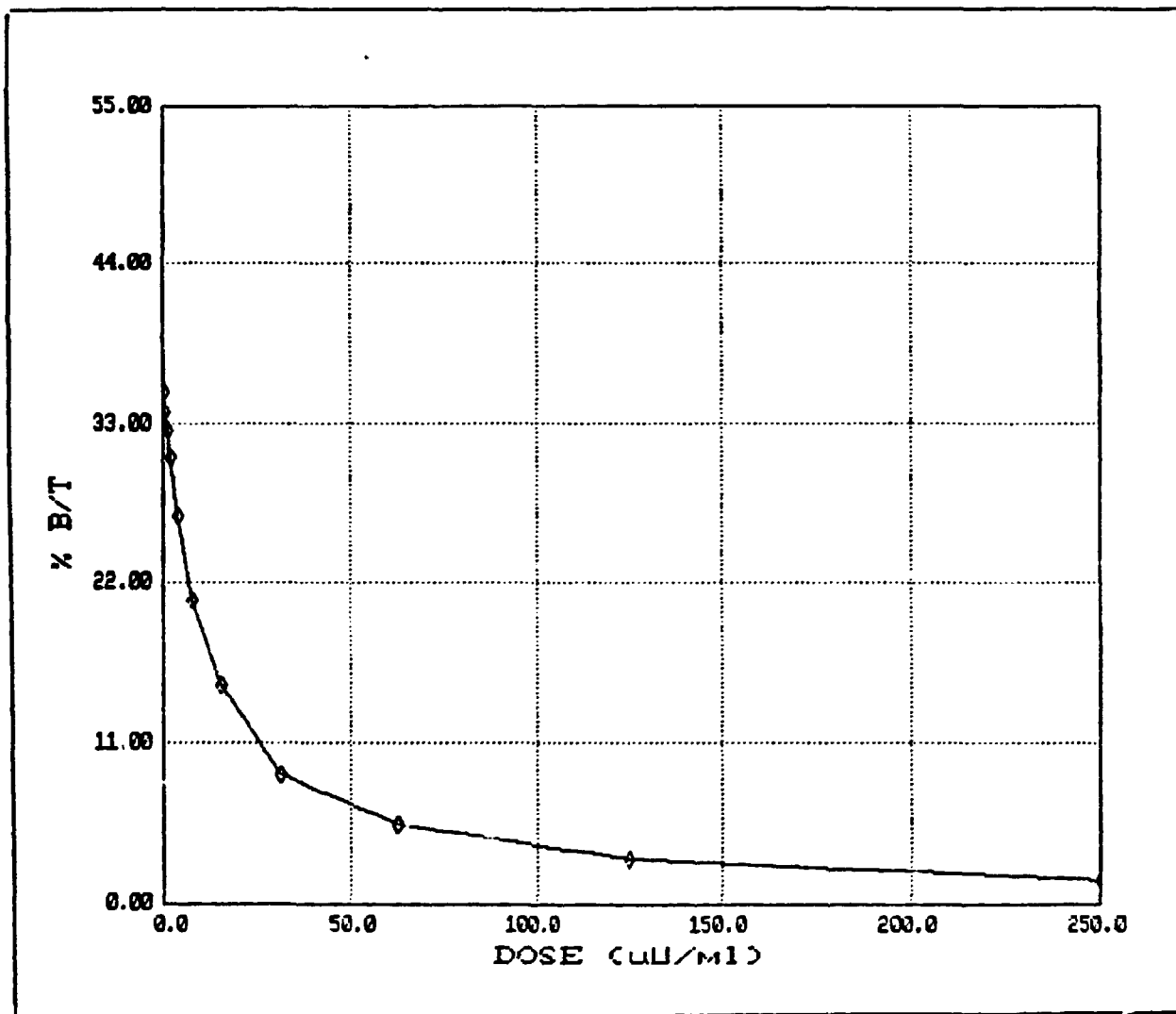


Figura 21: Curva padrão do ensaio de hTSH em decuplicata, separado com a partícula magnética importada.

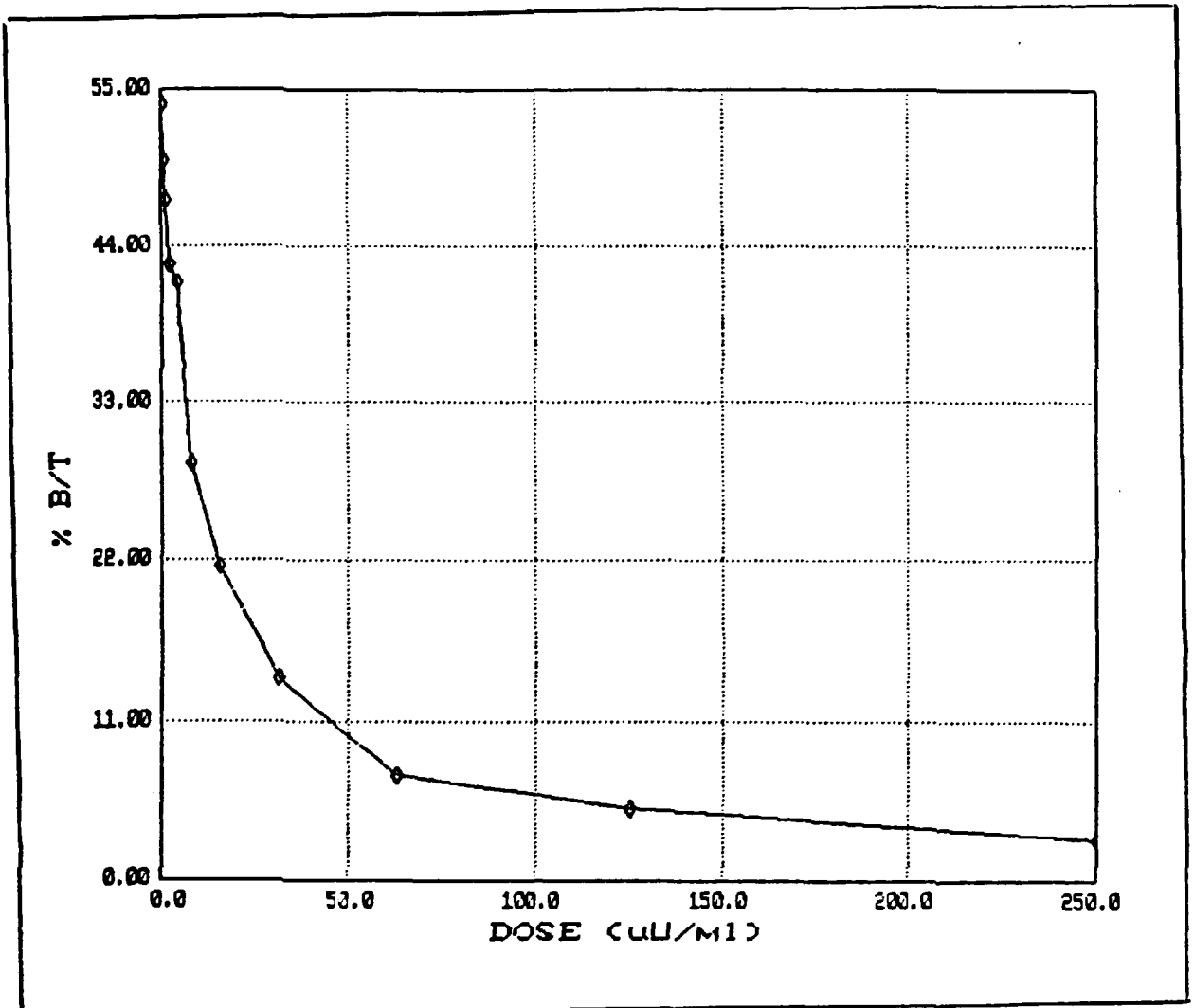


Figura 22: Curva padrão do ensaio de hTSH em decuplicata, separado com o 2º Anticorpo IPEN.

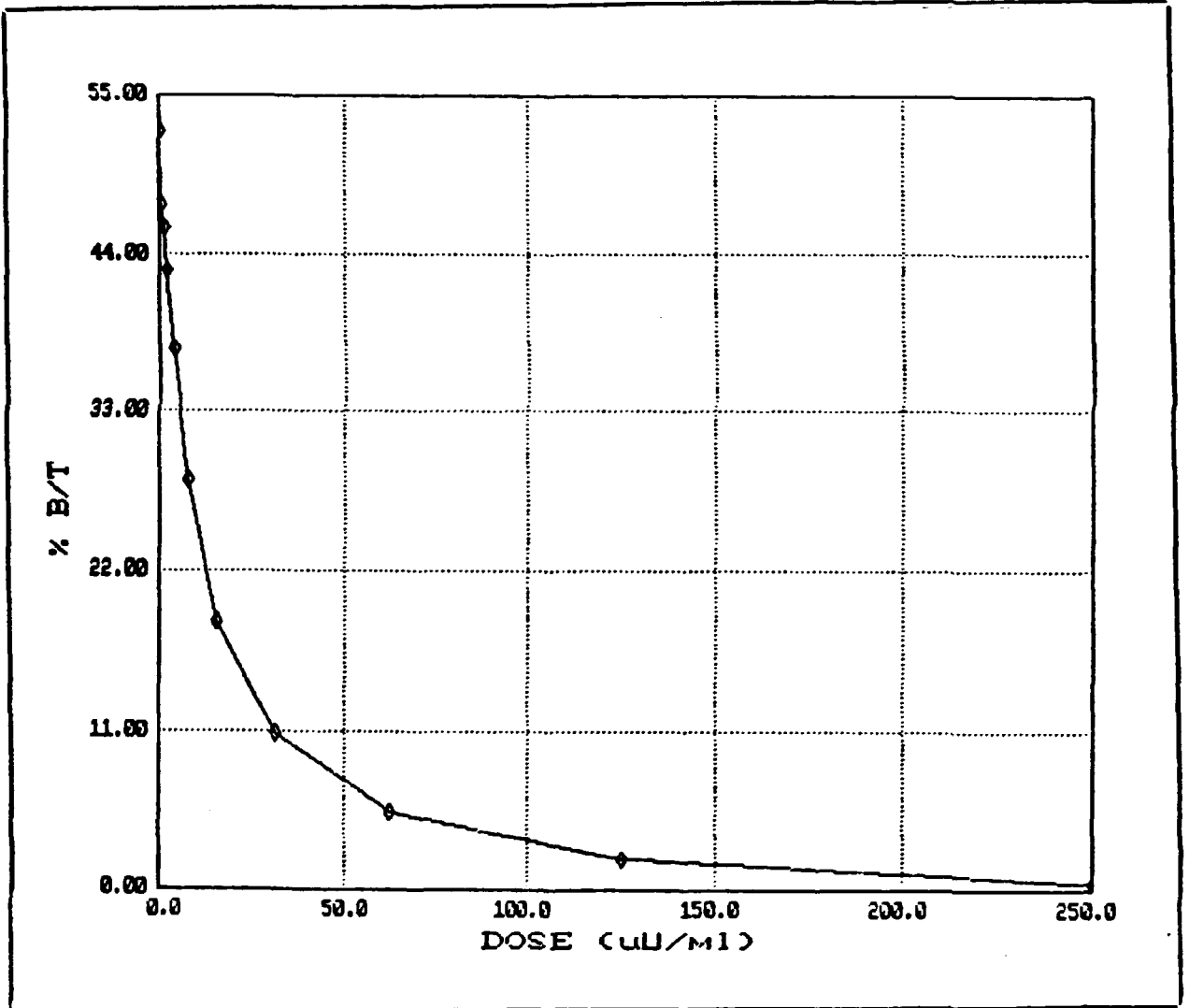
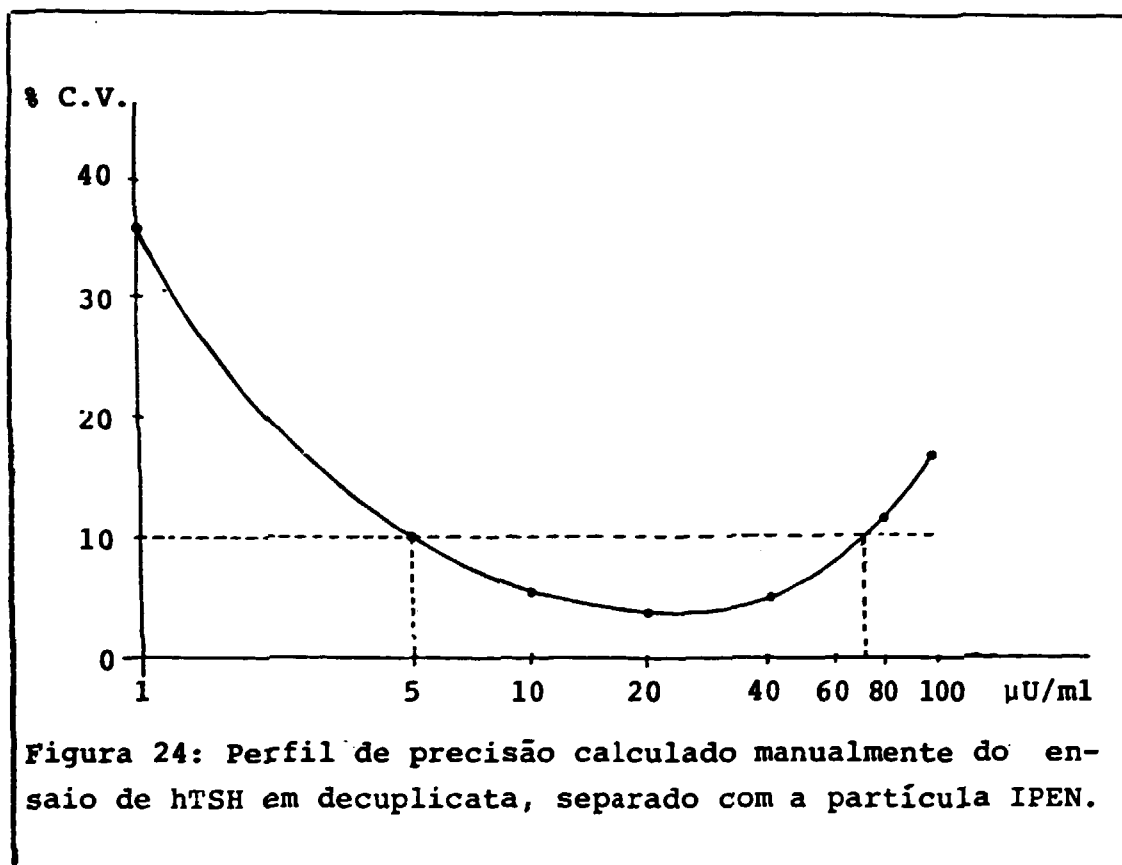
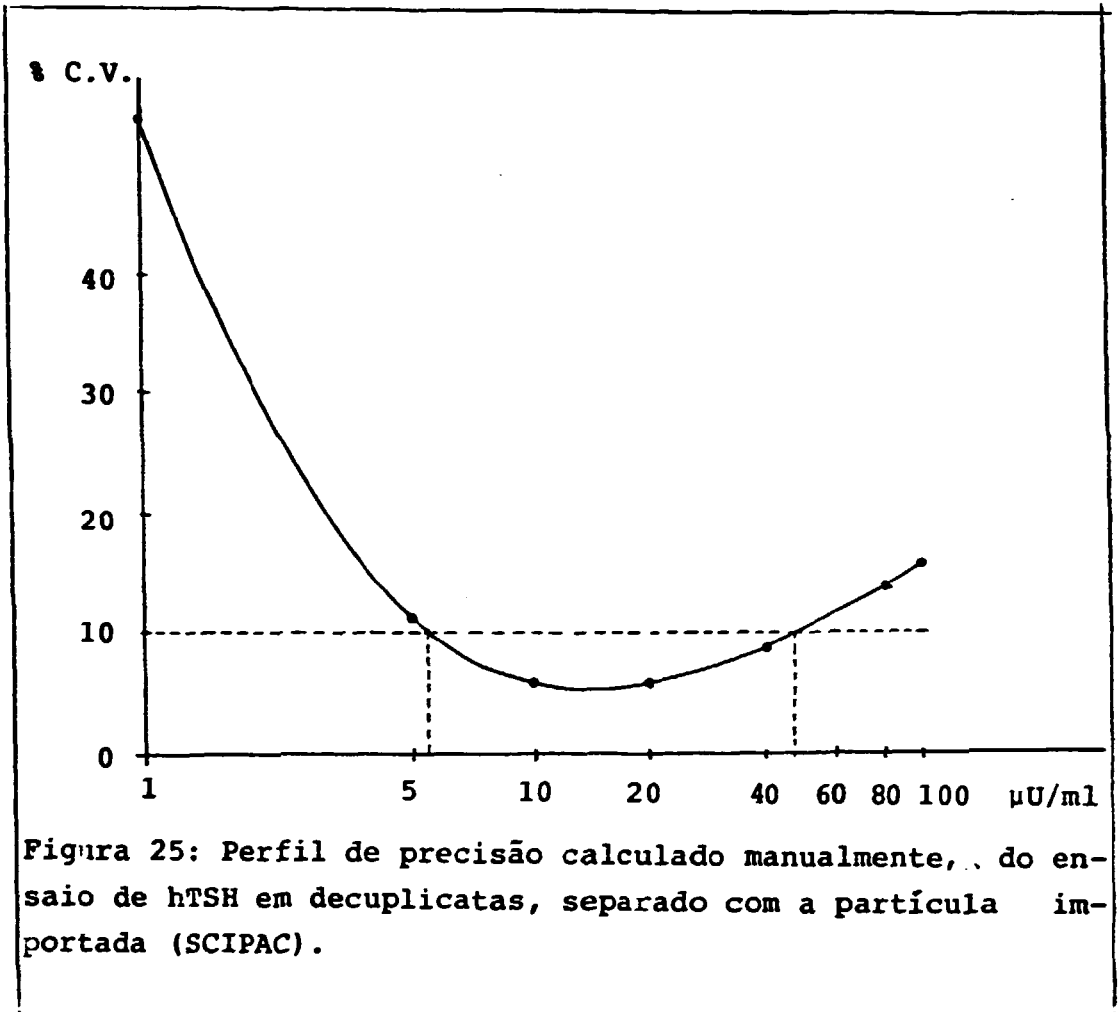


Figura 23: Curva padrão do ensaio de hTSH em decuplicata, separado com o Polietilenoglicol.





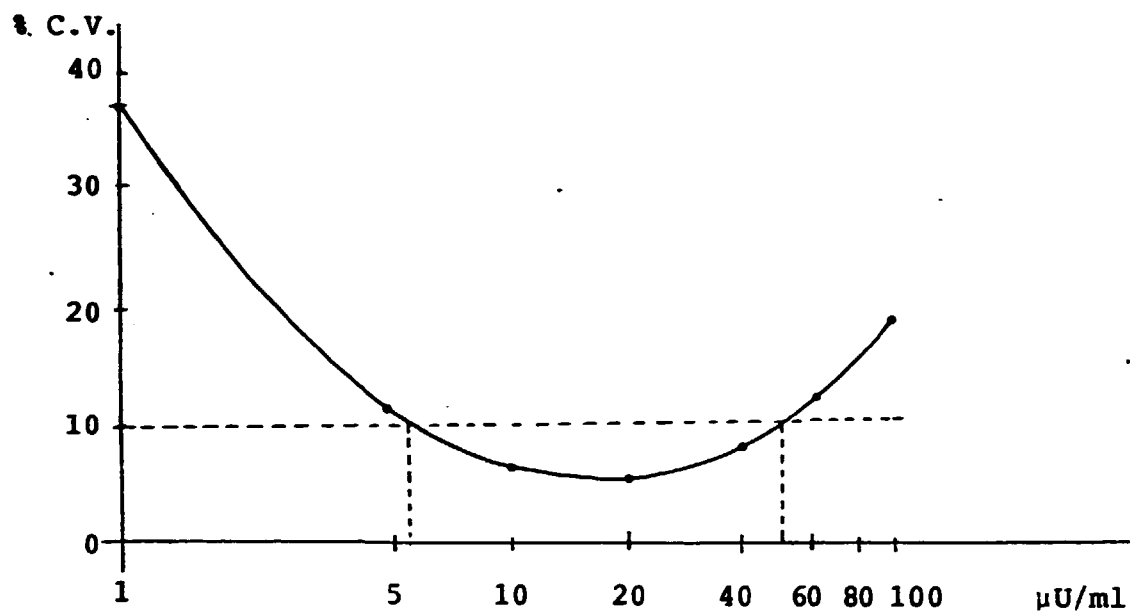
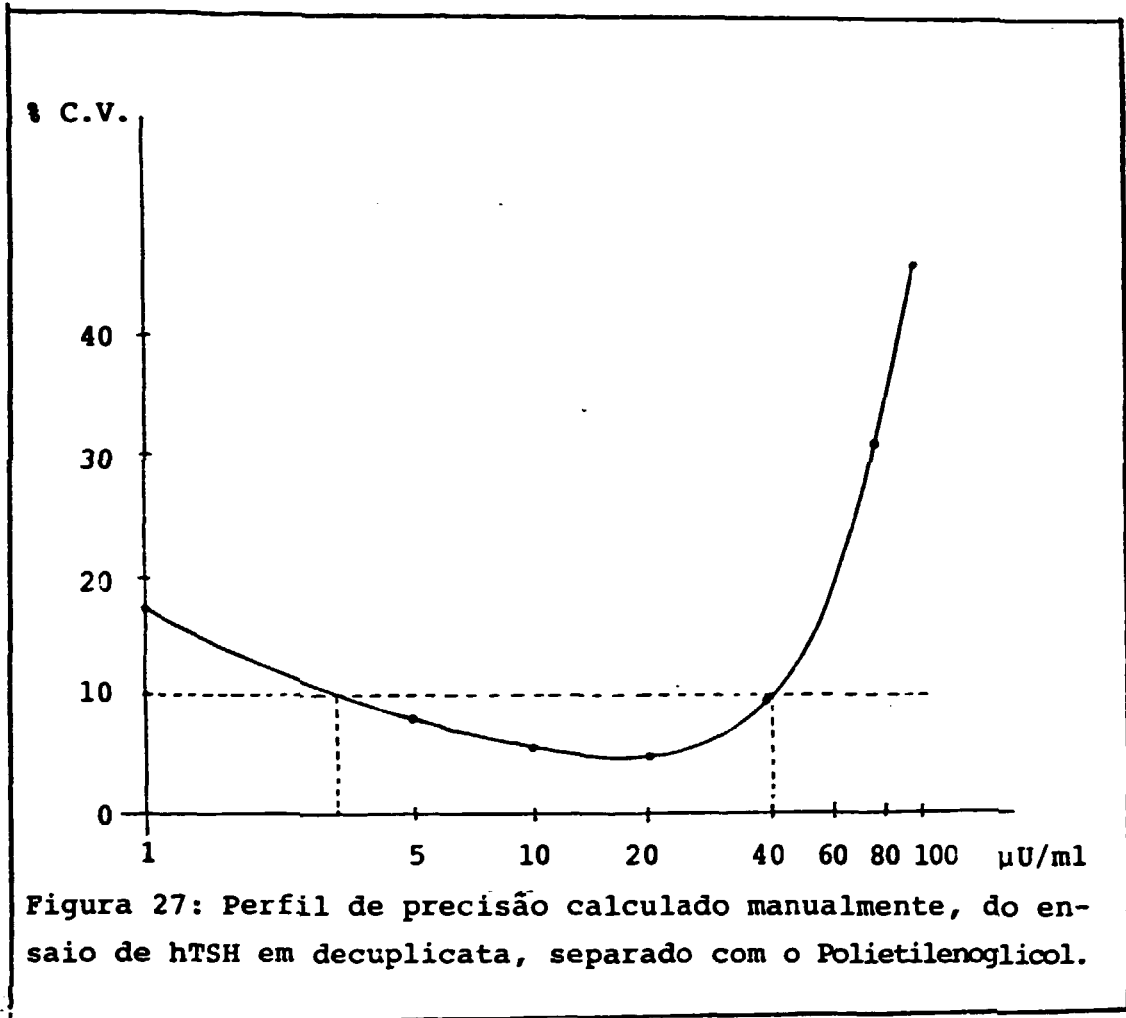


Figura 26: Perfil de precisão calculado manualmente, do ensaio de hTSH em decuplicata, separado com o 29 Anticorpo IPEN.



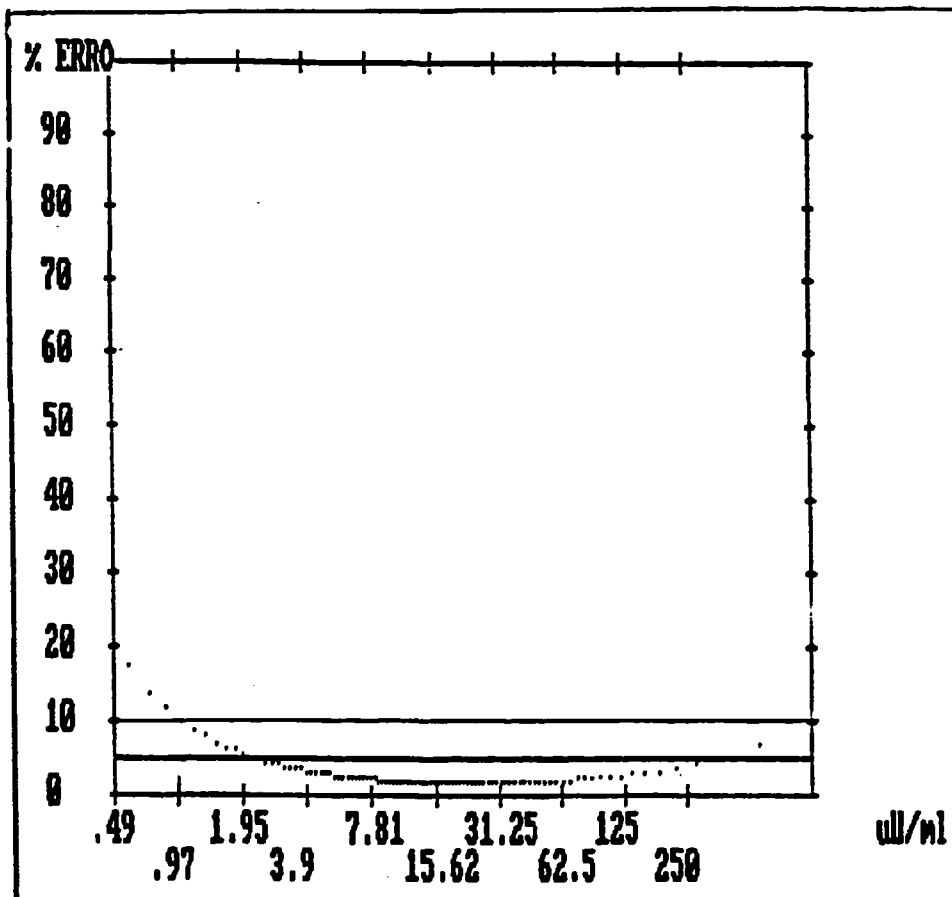


Figura 28: Perfil de precisão, obtido pelo programa computacional RIAKALK, de um ensaio de HTSH em decuplicata, separado com a partícula IPEJ.

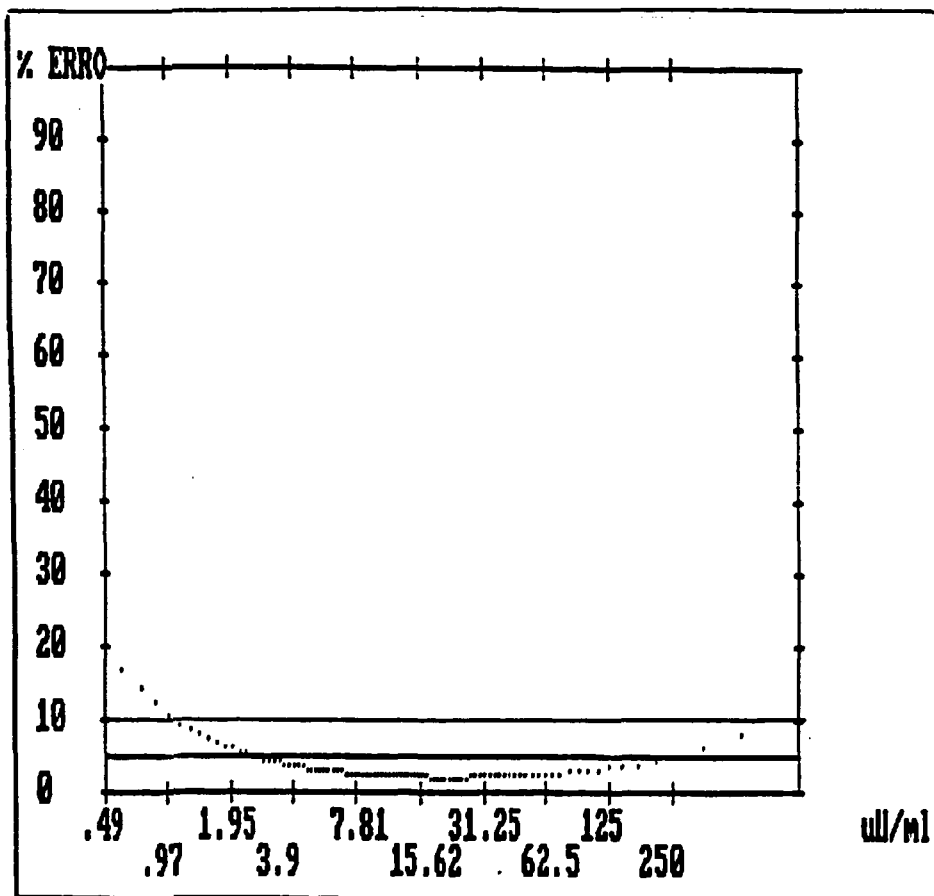


Figura 29: Perfil de precisão, obtido pelo programa computacional RIAKALK, de um ensaio de hTSH em decuplicata, separado com a partícula importada (SCIPAC)

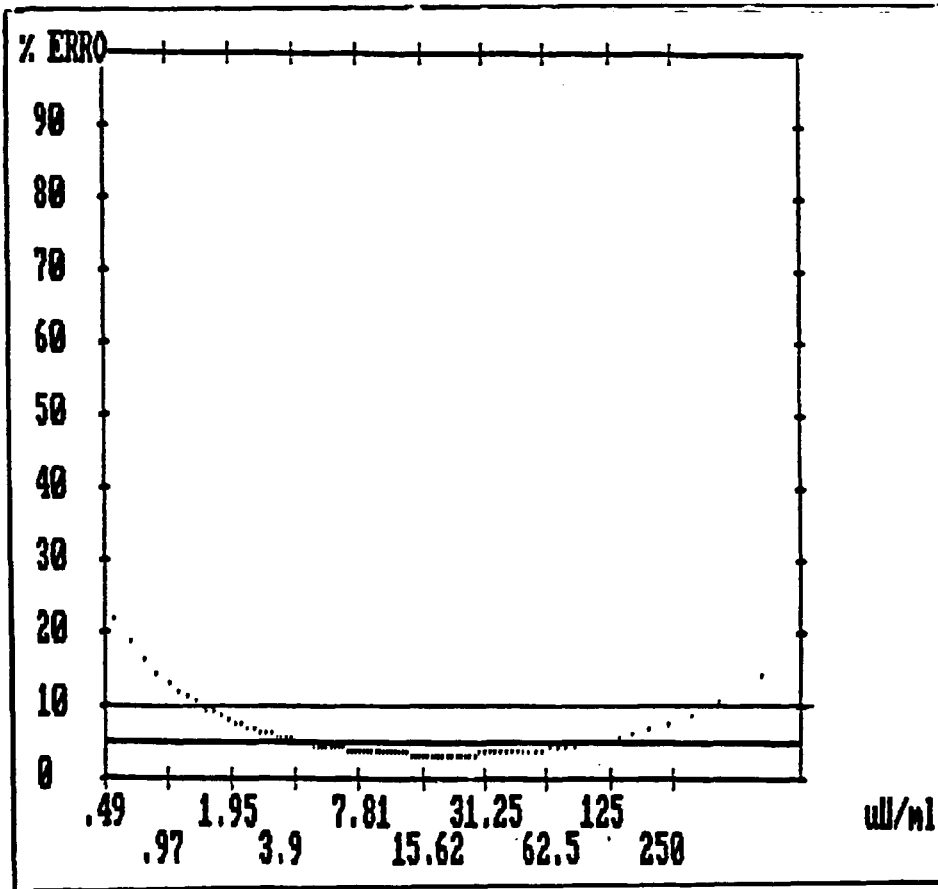


Figura 30: Perfil de precisão, obtido pelo programa computacional RIAKALK, de um ensaio de hTSH em decuplicata, separado com o 2º Anticorpo IPEN.

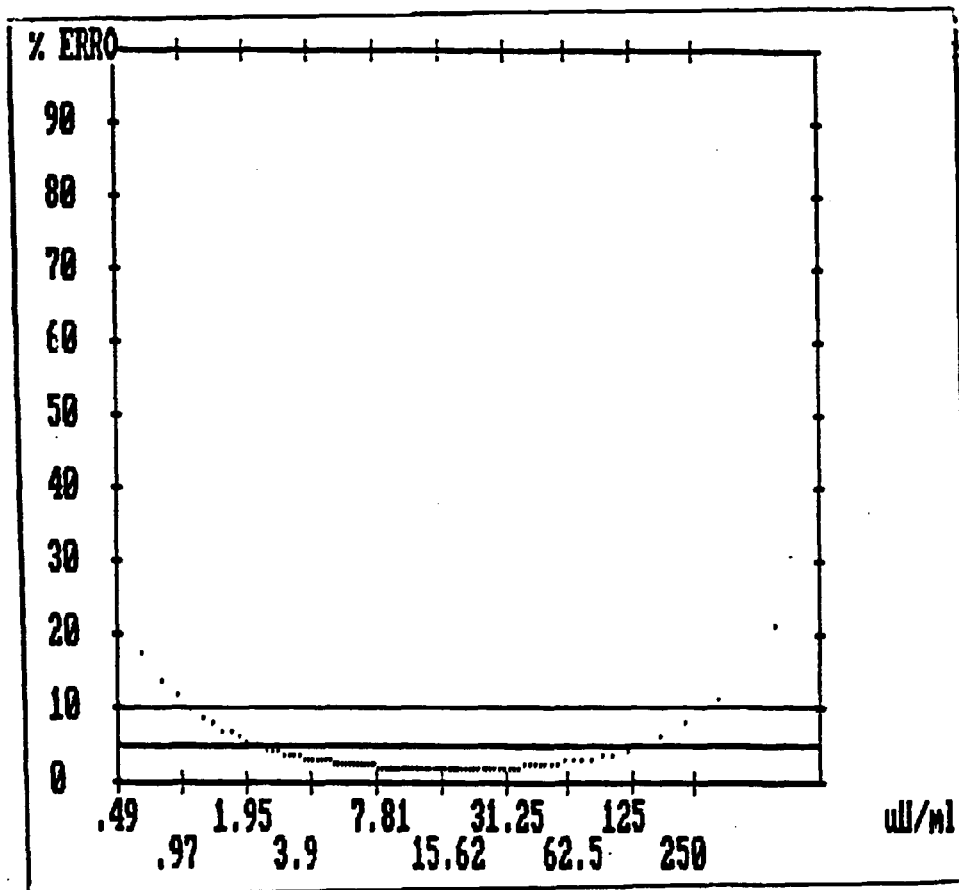


Figura 31: Perfil de precisão, obtido pelo programa computacional RIAKALK, de um ensaio de hTSH em decuplicata, separado com o Polietilenoglicol.

TABELA XXI

DADOS OBTIDOS DOS ENSAIOS DE HTSH COM DECUPLICATAS DA CURVA PADRÃO E DOS
PERFIS DE PRECISÃO OBTIDOS MANUALMENTE E COM O PROGRAMA RIAKALK

MEIOS DE SEPARAÇÃO	NSB (%)	B ₀ (%)	RER		INTERVALO DE DETERMINAÇÃO (μ U/ml)	MÁXIMA PRECISÃO (% CV)	D.M.D.* (μ U/ml)	P.P. RIAKALK		
			m	b				INTERVALO DE DETERMINAÇÃO (μ U/ml)	MÁXIMA PRECISÃO (% CV)	D.M.D. (μ U/ml)
P. IPEN	0,65	31,10	0,646 0,015	0,177	5,00-70,00	3,60	0,49	1,00-300,00	2,00	2,33
P. SCIPAC	0,45	35,20	0,479 0,016	0,359	5,50-48,00	5,50	0,70	1,00-300,00	2,00	2,66
2 φ Ac	1,57	53,94	0,759 0,034	0,197	5,40-50,00	5,20	0,76	1,50-300,00	3,50	4,36
PEG	5,39	52,52	0,007 0,0001	0,731	3,30-41,00	4,80	0,15	1,00-250,00	2,00	2,29

(*) Cálculo da sensibilidade realizado de acordo com a definição de Rodbard e cols. (69).

Observamos, com os dados destes perfis de precisão calculado manualmente que a partícula magnética IPEN, apresentou o melhor desempenho para as altas doses, devido aos valores extremamente baixos de erros, na curva RER, relativos às baixas ligações. Isto poderia ser explicado pelo baixo valor do NSB. Se assim for, porém, não se entende por que a partícula importada (SCIPAC), não apresenta o mesmo desempenho. Talvez isto seja devido ao diferente anticorpo acoplado às duas partículas ou ao fato que a partícula IPEN foi recentemente acoplada. Uma análise dos RERs relativos às duas partículas magnéticas, mostra praticamente a mesma inclinação para as duas curvas, porém uma intersecção bem diferente com o eixo Y. Isto indicaria uma tendência generalizada à obtenção de erros menores por parte da partícula IPEN, ao longo de toda a curva.

Por algum mecanismo não bem esclarecido, na separação com PEG, o erro não dependeu do valor da dose. No RER, as doses altas (B/T baixos) se apresentaram bastante imprecisas, talvez piores que com as outras técnicas. Nas doses baixas (B/T alto) os erros se mostraram inferiores a outras técnicas, especialmente ao ^{29}Ac , que apresenta o mesmo nível de B_0 e menor NSB. Isto fez com que o intervalo de precisão desta técnica, tenha se tornado mais amplo para as doses baixas com conseqüente maior sensibilidade. Existe a dúvida que um P.P. gerado neste tipo de RER sem correlação significativa ($r = 0,0071$), não seja estatisticamente válido. De fato a flutuação dos pontos no mesmo P.P. foi elevada.

A técnica de separação mediante o ^{29}Ac , po-

de ser considerada como aquela que apresentou o desempenho padrão: valores intermediários de intervalo de determinação, de precisão máxima e de NSB. Seus parâmetros de qualidade, foram comparáveis àqueles relativos à SCIPAC.

Já os dados obtidos pelo programa computacional, não apresentaram nenhuma diferença significativa entre os métodos, excetuando-se a separação com PEG, que apresentou um intervalo ligeiramente menor para as altas doses.

4.4.2 - Perfis de precisão obtidos mediante duplicatas de "n" desconhecidos

Este segundo esquema de cálculo dos perfis de precisão, foi também realizado de acordo com a metodologia proposta por EKINS (29), utilizando duplicatas da curva padrão, de soros controle e de 38 soros desconhecidos, com um total de $n = 100$ dosagens por método de separação, em um único intra-ensaio.

4.4.2.1 - Dados obtidos para a obtenção do perfil de precisão da separação com a partícula IPEN de "n" desconhecidos.

Nas tabelas XXII e XXIII e figura 32, são mostrados os dados obtidos para construção deste perfil de precisão.

TABELA XXII

VALORES MÉDIOS DE % B/T E SEUS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO,
 COM DUPLICATAS DE "n" DESCONHECIDOS DE UM ENSAIO DE HTSH,
 SEPARADO COM A PARTÍCULA MAGNÉTICA IPEN

INTERVALOS DE % B/T	% B/T	σ_R
0 - 5	3,12	0,10
5 - 10	6,37	0,10
10 - 15	11,37	0,37
15 - 20	16,81	0,60
20 - 25	24,45	0,50
25 - 30	27,00	0,85
30 - 35	32,55	1,11
35 - 40	36,91	0,81

A equação da reta obtida foi:

$$Y = 0,027 X + 0,027$$

$$r = 0,911$$

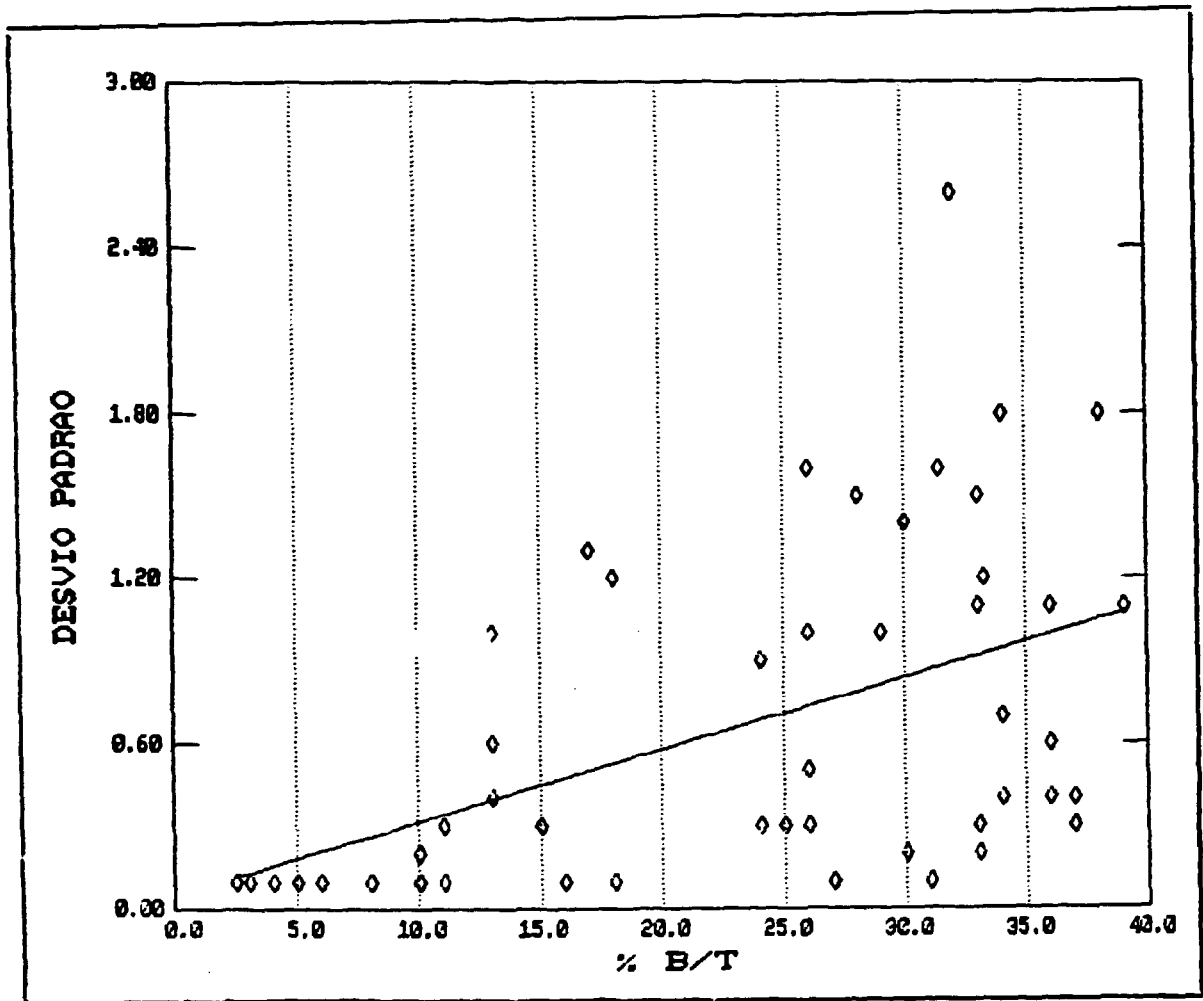


Figura 32: RER de um ensaio de hTSH com duplicatas de "n" desconhecidos, separado com a partícula IPEN.

TABELA XXI II

VALORES TEÓRICOS OBTIDOS PARA A CONSTRUÇÃO DO PERFIL DE PRECISÃO DO ENSAIO DE hTSH COM "n" DESCONHECIDOS, SEPARADO COM A PARTÍCULA MAGNÉTICA IPEN.

DOSE (μ U/ml)	% B/T	α_R	Tg	σ_D	% CV
1,00	37,40	1,04	3,28	0,32	32,00
5,00	28,40	0,79	1,58	0,50	10,00
10,00	22,20	0,63	0,97	0,65	6,50
20,00	15,20	0,44	0,54	0,81	4,00
40,00	7,80	0,24	0,21	1,13	2,80
60,00	5,30	0,17	0,082	2,07	3,50
80,00	4,10	0,14	0,052	2,65	3,30
100,00	3,20	0,11	0,033	3,44	3,50

4.4.2.2 - Dados para a obtenção do perfil de precisão com partículas magnéticas importadas (SCIPAC, Limited), de um ensaio de hTSH com "n" desconhecidos

Os dados para a construção do perfil de precisão, são mostrados nas tabelas XXIV e XXV e figura 33.

TABELA XXIV

VALORES MÉDIOS DE % B/T E SEUS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO DO
 ENSAIO DE HTSH, COM DUPLICATAS DE "n" DESCONHECIDOS,
 SEPARADO COM A PARTÍCULA MAGNÉTICA IMPORTADA

INTERVALOS DE % B/T	$\bar{\% B/T}$	$\bar{\sigma}_R$
0 - 5	3,91	0,16
5 - 10	7,48	0,30
10 - 15	12,76	1,33
15 - 20	17,53	0,44
20 - 25	24,25	0,80
25 - 30	27,97	0,62
30 - 35	32,04	1,68
35 - 40	37,26	1,21
40 - 45	41,75	1,10

A equação da reta calculada foi:

$$Y = 0,025 X + 0,278$$

$$r = 0,646$$

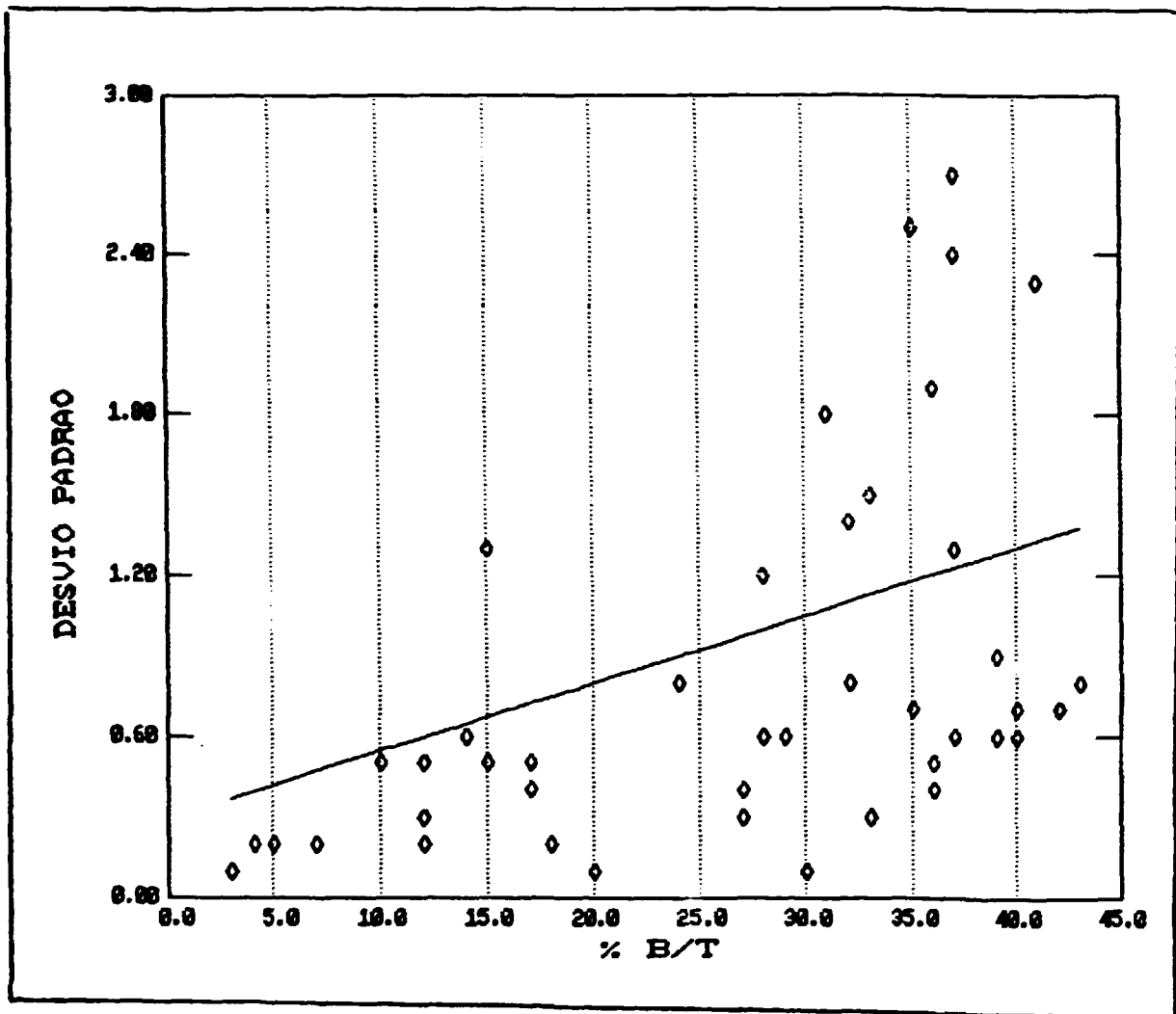


Figura 33: RER de um ensaio de hTSH com duplicatas de "n" desconhecidos, separado com a partícula importada (SCIPAC).

TABELA XXV

VALORES TEÓRICOS OBTIDOS PARA A CONSTRUÇÃO DO PERFIL DE PRECISÃO DO ENSAIO DE HTSH, COM "n" DESCONHECIDOS, SEPARADO COM A PARTÍCULA MAGNÉTICA IMPORTADA.

DOSE (μ U/ml)	% B/T	σ_R	Tg	σ_{rel}	% CV
1,00	43,00	1,35	3,83	0,35	35,00
5,00	29,00	1,00	1,73	0,35	11,60
10,00	22,00	0,83	0,93	0,35	8,90
20,00	14,00	0,63	0,65	0,35	4,80
40,00	7,70	0,47	0,23	2,04	5,10
60,00	3,70	0,37	0,09	4,12	6,90
80,00	3,20	0,36	0,026	13,00	17,20
100,00	2,50	0,34	0,019	17,00	17,90

4.4.2.3 - Dados para a obtenção do perfil de precisão com o 2º Anticorpo IPEN, de um ensaio de HTSH com "n" desconhecidos

Nas tabelas XXVI e XXVII e figura 14, não mostrados os dados obtidos para a construção do perfil de precisão.

TABELA XXVI

VALORES MÉDIOS DO % B/T E SEUS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO,
COM DUPLICATAS DE "n" DESCONHECIDOS, DE UM EN-
SAIO DE hTSH, SEPARADO COM O 2º ANTICORPO IPEN

INTERVALOS DE % B/T	$\bar{\% B/T}$	$\bar{\sigma}_R$
0 - 5	2,20	0,51
5 - 10	6,97	0,34
10 - 15	13,46	0,67
15 - 20	18,72	1,30
20 - 25	22,17	0,88
25 - 30	25,43	1,47
35 - 40	38,13	1,19
40 - 45	42,12	1,90
45 - 50	47,99	1,96
50 - 55	52,38	2,50
55 - 60	57,17	0,90

A equação da reta foi:

$$Y = 0,026 X + 0,479$$

$$r = 0,718$$

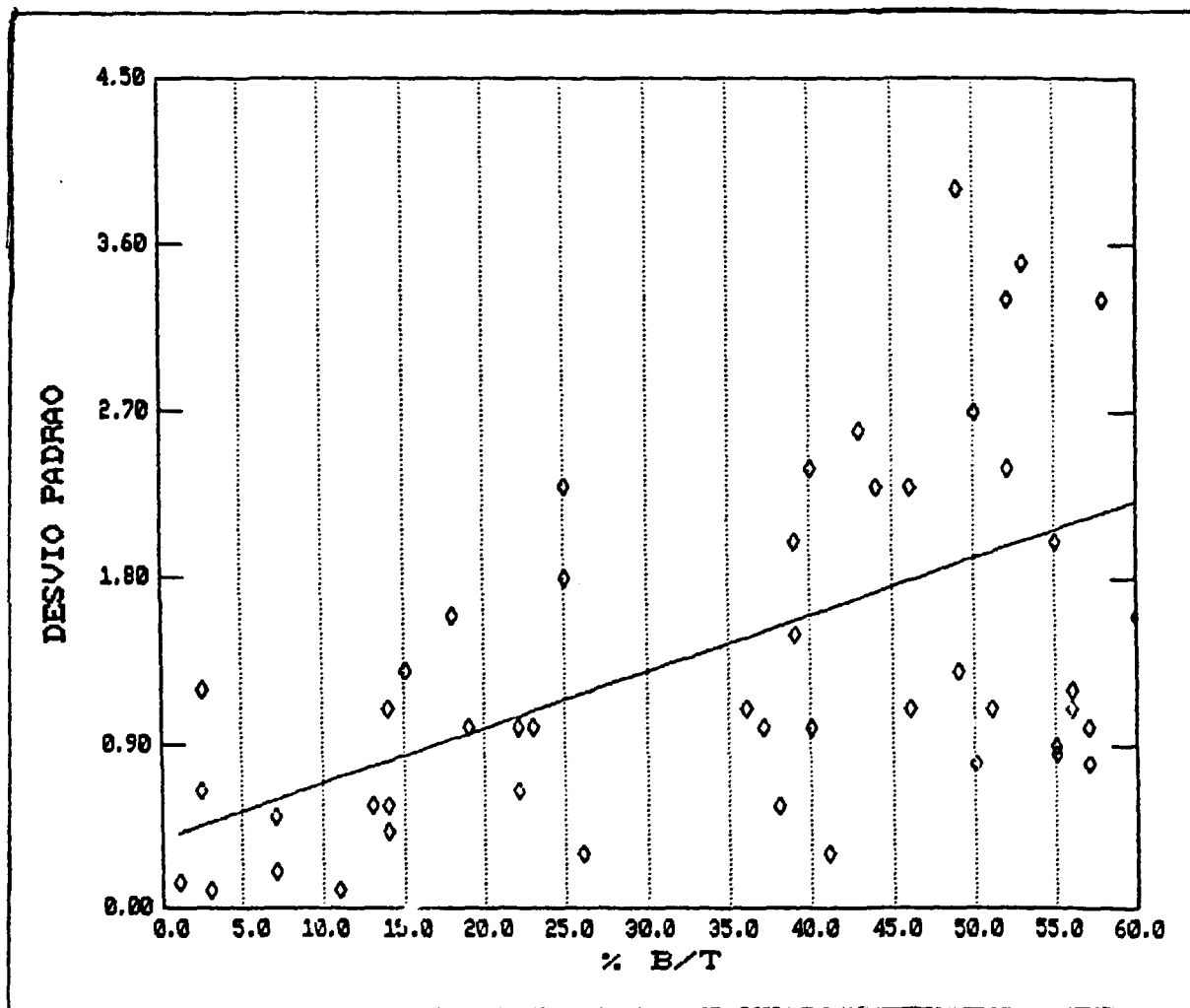


Figura 34: RER de um ensaio de hTSH com duplicatas de "n" desconhecidos, separado com o 29 Anticorpo IPEN.

TABELA XXVII

VALORES TEÓRICOS OBTIDOS PARA A CONSTRUÇÃO DO PERFIL DE PRE-
CISÃO DO ENSAIO DE hTSH, COM "n" DESCONHECIDOS,
SEPARADO COM O φ ANTICORPO

DOSE (μ U/ml)	% B/T	σ_R	Tg	σ_D	% CV
1,00	58,00	1,99	4,20	0,47	47,00
5,00	45,50	1,66	2,60	0,64	12,80
10,00	33,20	1,34	1,55	0,87	8,70
20,00	20,50	1,01	0,76	1,33	6,70
40,00	9,70	0,73	0,34	2,15	5,40
60,00	5,70	0,63	0,15	4,18	7,00
80,00	4,50	0,60	0,048	12,40	15,50
100,00	3,50	0,57	0,035	16,30	16,30

4.4.2.4 - Dados para a obtenção do perfil de pre-
cisão com o Polietilenoglicol

Estes dados são apresentados nas tabelas
XXVIII e XXIX e figura 35.

TABELA XXVIII

VALORES MÉDIOS DO % B/T E DESVIOS PADRÃO DO ENSAIO DE HTSH,
 COM DUPLICATAS DE "n" DESCONHECIDOS,
 SEPARADO COM O POLIETILENOGLICOL

INTERVALOS DO % B/T	% B/T	D.P.
0 - 5	3,33	0,83
5 - 10	7,50	0,70
10 - 15	11,73	1,14
15 - 20	18,06	1,20
20 - 25	22,05	1,70
25 - 30	29,25	3,50
30 - 35	33,63	1,50
35 - 40	37,55	2,28
40 - 45	43,66	2,90
45 - 50	47,40	2,18
50 - 55	51,71	2,34
55 - 60	56,80	3,70

A equação da reta foi:

$$Y = 0,044 X + 0,653$$

$$r = 0,793$$

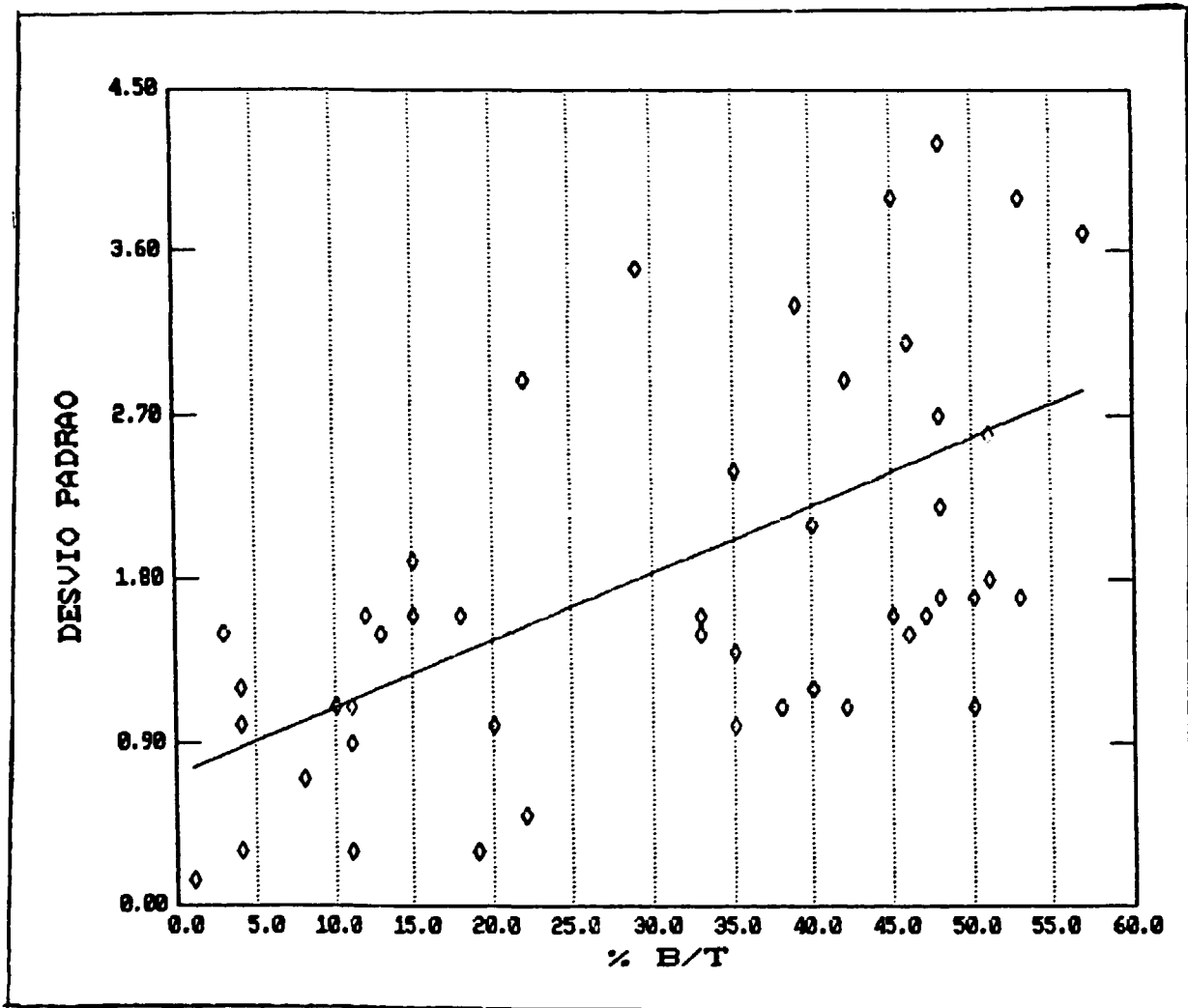


Figura 35: RER de um ensaio de hTSH com duplicatas de "n" desconhecidos, separado com o Polietilenoglicol.

TABELA XXIX

VALORES TEÓRICOS OBTIDOS PARA A CONSTRUÇÃO DO PERFIL DE PRE-
CISÃO DO ENSAIO DE hTSH COM "n" DESCONHECIDOS,
SEPARADO COM O PEG

DOSE (μ U/ml)	% B/T	σ_R	Tg	σ_D	% CV
1,00	51,50	2,27	6,88	0,329	32,90
5,00	36,50	2,26	2,65	0,853	17,10
10,00	27,00	1,84	1,50	1,227	12,30
20,00	16,70	1,34	0,80	1,735	8,70
40,00	6,70	0,95	0,30	3,159	7,90
60,00	4,00	0,83	0,16	5,181	8,60
80,00	1,70	0,73	0,06	12,130	15,20
100,00	1,50	0,72	0,037	19,43	19,40

4.4.2.5 - Perfis de precisão

Nas figuras 36 a 39 são mostradas as respectivas curvas padrão e de 40 a 43 os perfis de precisão dos ensaios de hTSH com duplicatas de "n" desconhecidos culminando com os dados teóricos obtidos destas curvas, apresentados na tabela XXX.

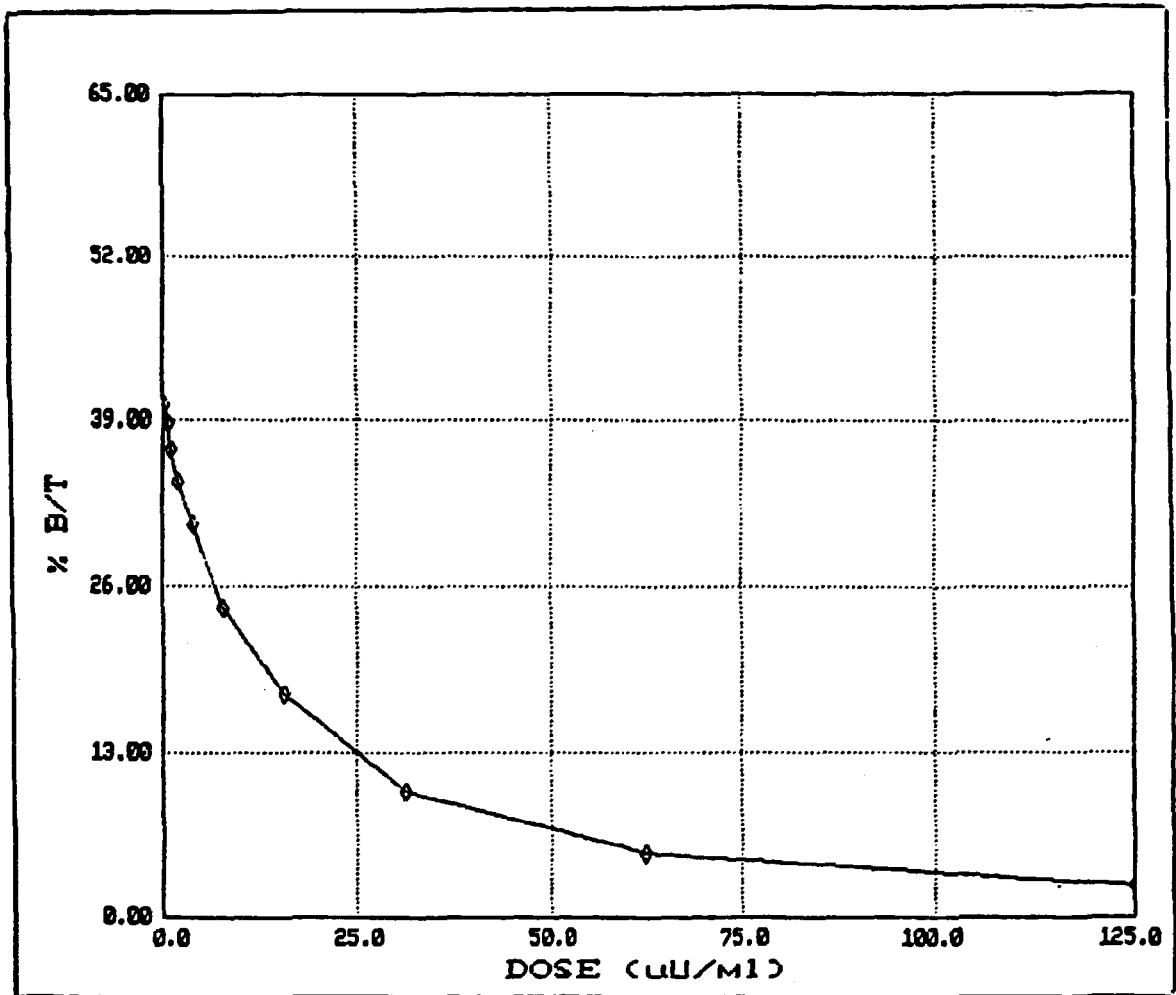


Figura 36: Curva padrão de hTSH de um ensaio com duplicatas de "n" desconhecidos, separado com a partícula magnética IPEN.

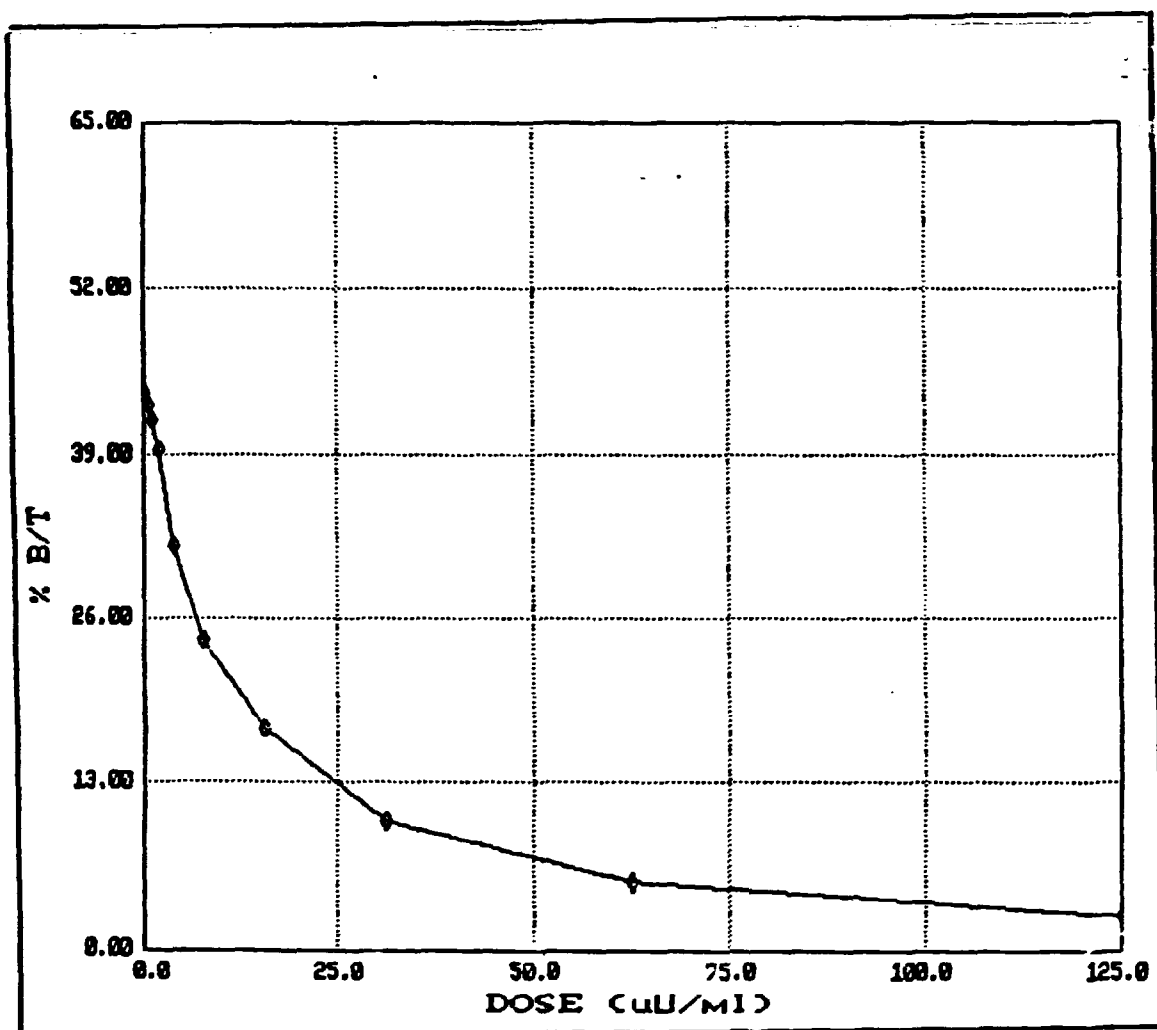


Figura 37: Curva padrão de HTSH de um ensaio com duplicatas de "n" desconhecidos, separado com a partícula magnética importada.

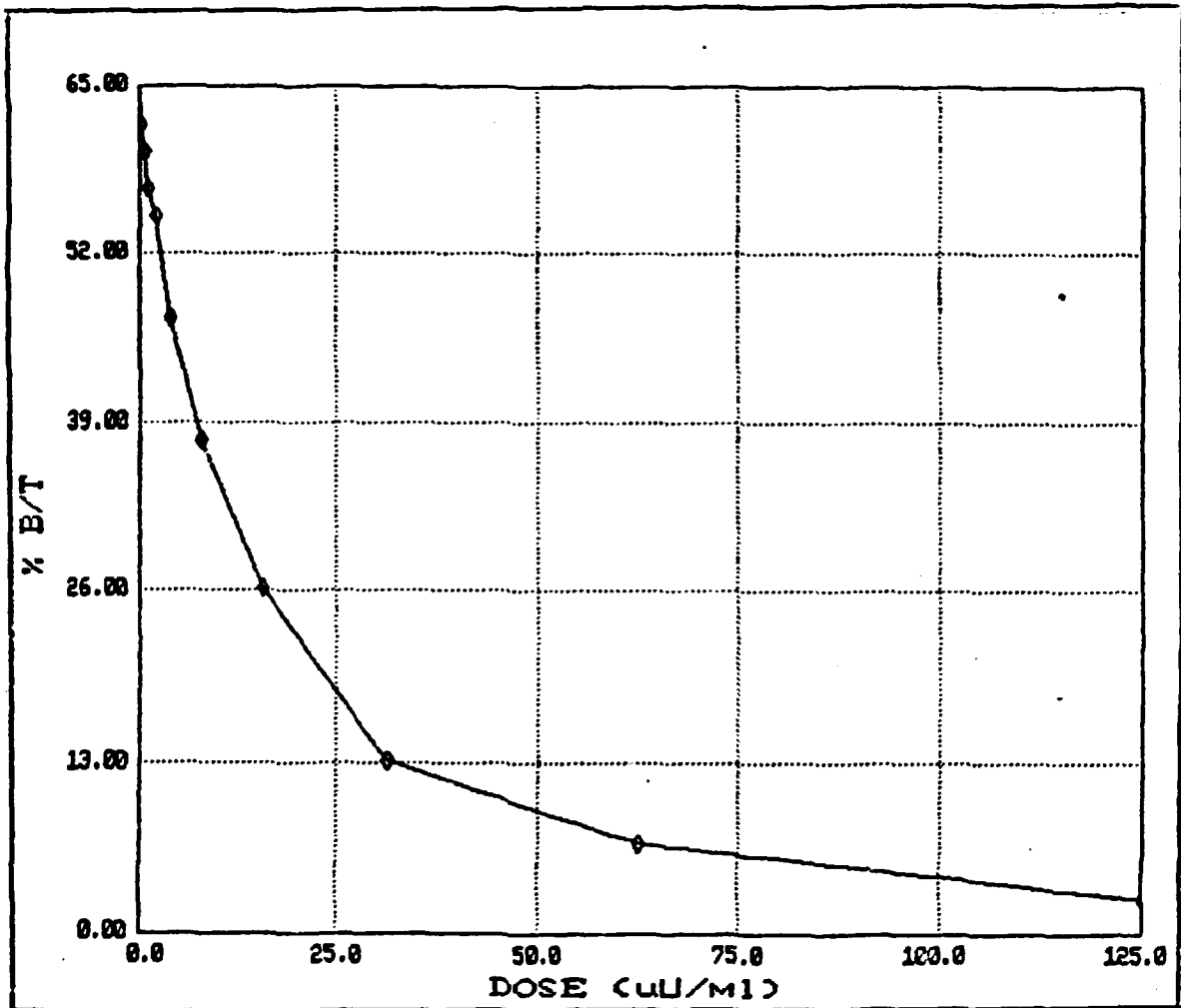


Figura 38: Curva padrão de hTSH de um ensaio com duplicatas de "n" desconhecidos, separado com o 2º Anticorpo IPEN.

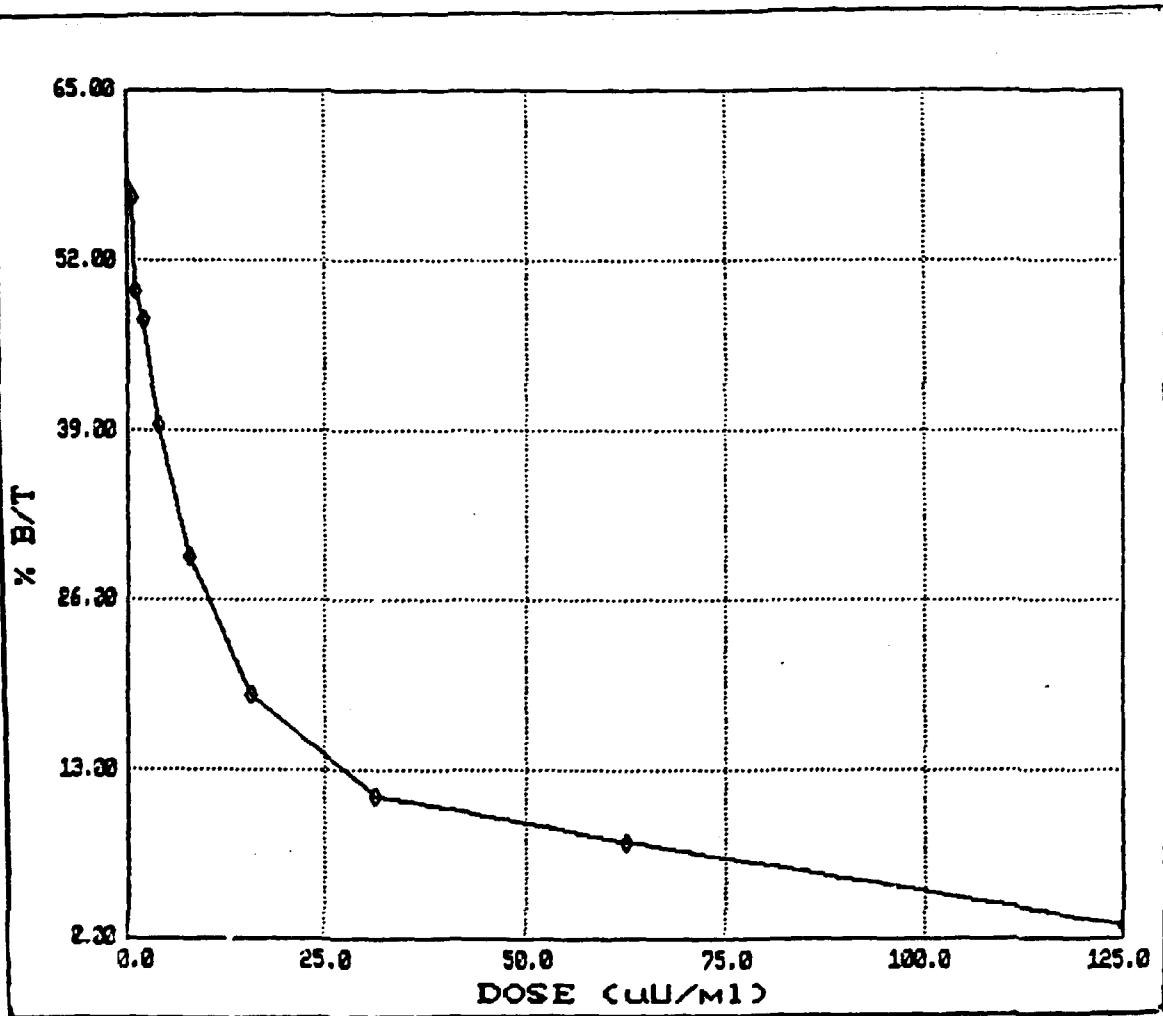
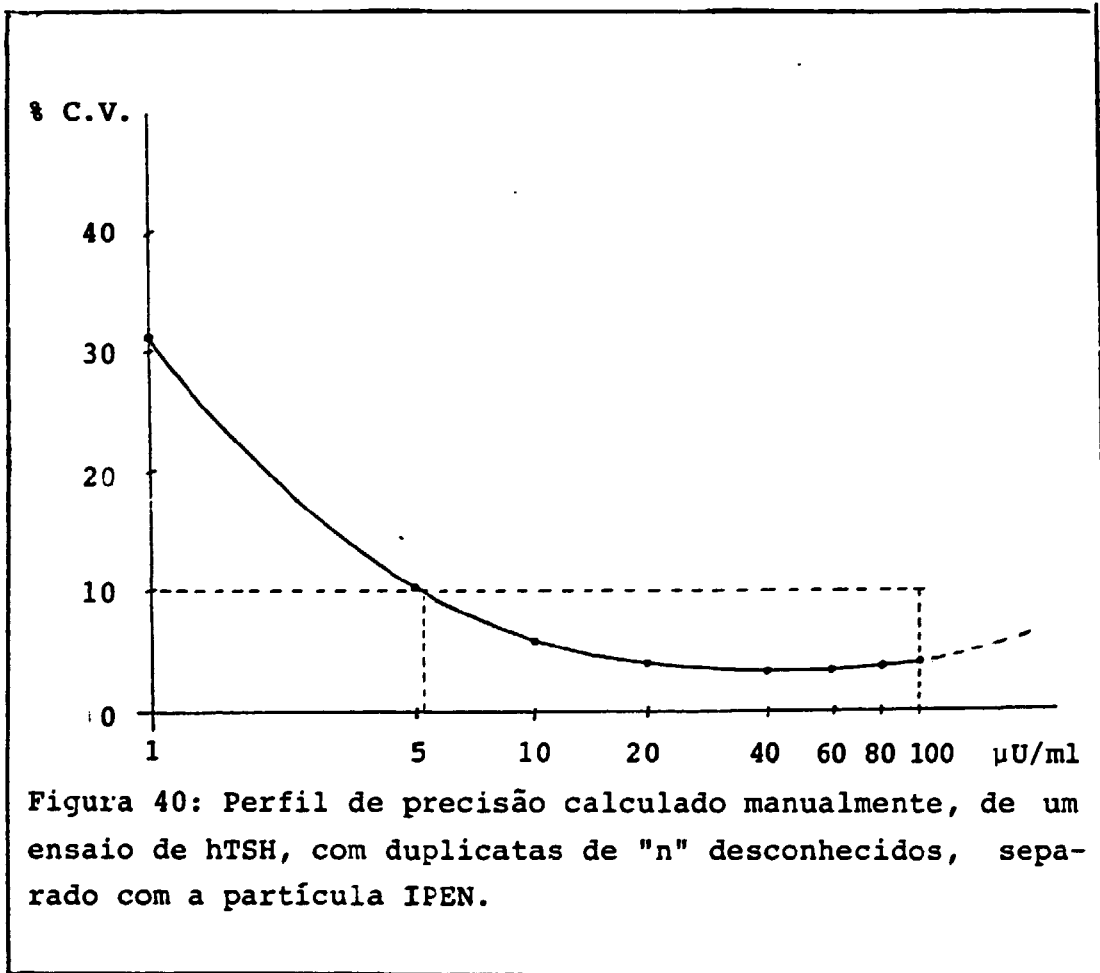


Figura 39: Curva padrão de hTSH de um ensaio com duplicatas de "n" desconhecidos, separado com o Polietilenoglicol.



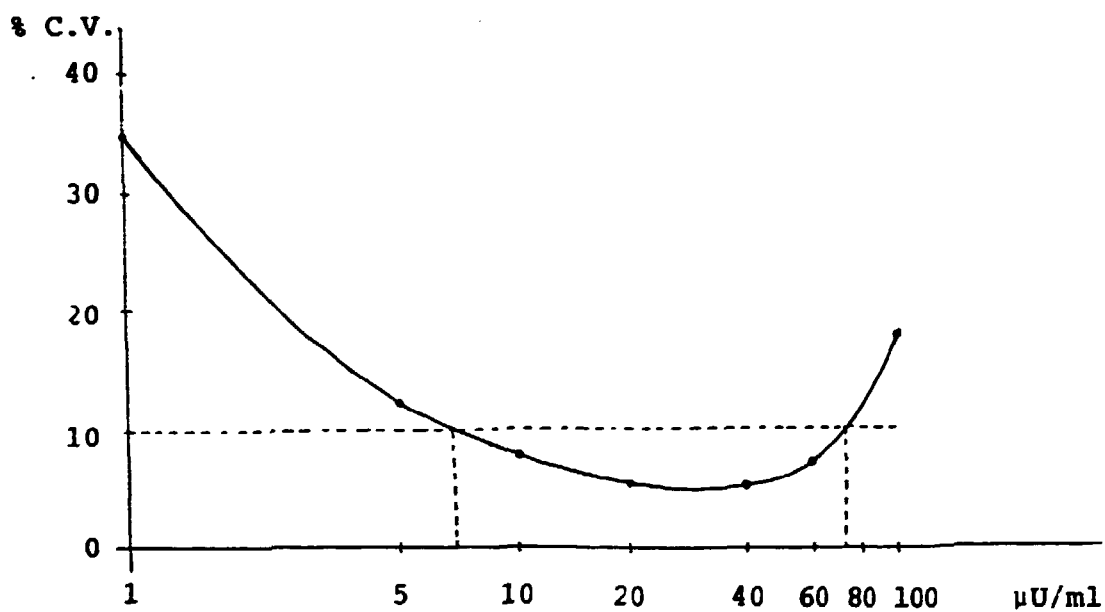
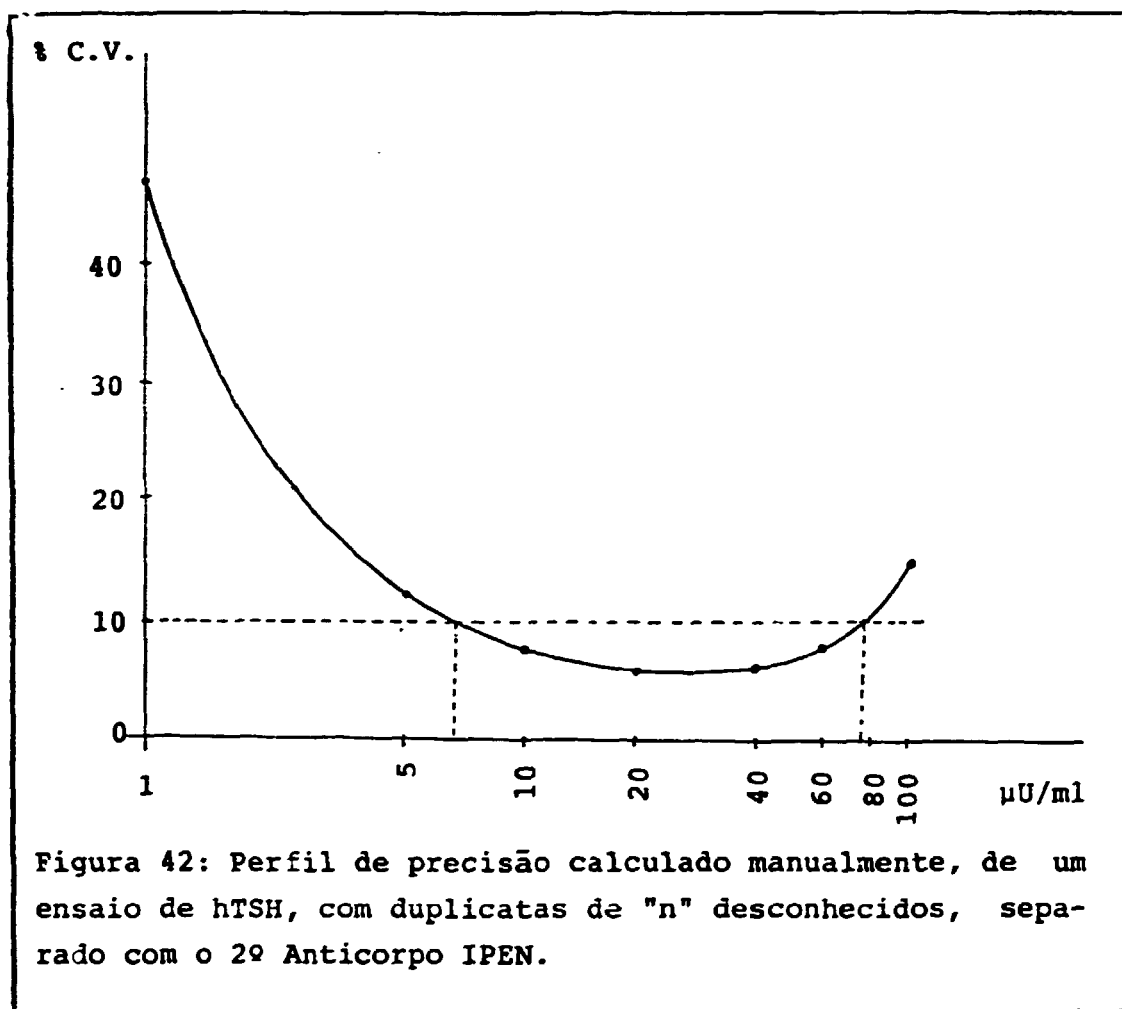


Figura 41: Perfil de precisão calculado manualmente, de um ensaio de hTSH, com duplicatas de "n" desconhecidos, separado com a partícula importada (SCIPAC).



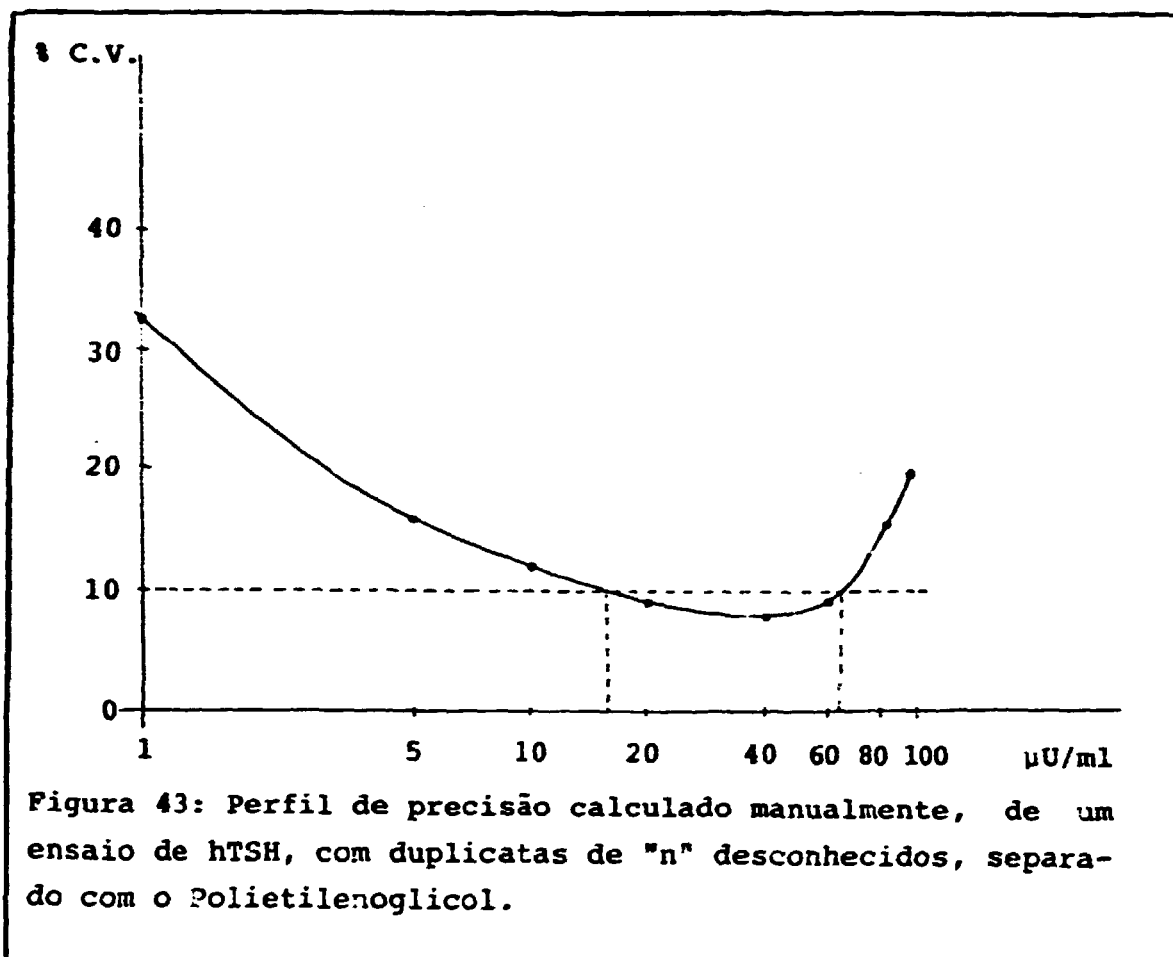


TABELA XXX

DADOS DOS ENSAIOS DE HTSH COM DUPLICATAS DA CURVA PADRÃO E DE "n"
DESCONHECIDOS, COM PERFIS DE PRECISÃO OBTIDOS MANUALMENTE
E COM O PROGRAMA RIAKALK

MEIOS DE SEPARAÇÃO	NSB (%)	B (%)	RER		P.P. MANUAL		P.P. RIAKALK	
			m	b	INTERVALO DE DETERMINAÇÃO (μU/ml)	MÁXIMA PRECISÃO (% CV)	INTERVALO DE DETERMINAÇÃO (μU/ml)	MÁXIMA PRECISÃO (% CV)
P. IPEN	1,21	40,74	0,911 0,027	0,027	5,20 - > 100,0	3,50	2,05 - 208,33	3,57
P. SCIPAC	0,43	43,99	0,646 0,025	0,278	7,00 - 74,00	5,00	2,27 - 200,00	3,57
2φ Ac	4,31	64,80	0,718 0,026	0,479	7,00 - 74,00	6,00	3,09 - 125,00	3,57
PEG	7,10	61,96	0,793 0,044	0,653	15,00 - 64,00	8,00	3,09 - 40,62	7,14

Neste segundo esquema de estudo dos perfis de precisão, foi confirmada, com uma correlação muito melhor ($r = 0,911$), a tendência da partícula IPEN a valores de erro geralmente mais baixos ao longo de toda a curva. Quando comparada com a SCIPAC, a partícula IPEN, apresenta a reta da relação erro-resposta (RER) com a mesma inclinação, porém com um valor menor de intersecção com o eixo Y. Isto permite uma excelente precisão, especialmente na região de doses altas.

O ^{29}Ac e a SCIPAC, reconfirmaram seus desempenhos comparáveis, com a maior ligação inespecífica (NSB) da primeira técnica sendo provavelmente compensada pela ligação específica (B_0) elevada, o que permite manter erros relativamente baixos.

O PEG, não manteve o desempenho demonstrado anteriormente para as doses baixas, sendo sua precisão e intervalo de determinação claramente inferiores àqueles demonstrados pelas outras técnicas.

O processamento automático desta vez discriminou melhor entre as várias técnicas, apresentando uma precisão claramente maior para as partículas magnéticas e claramente inferior para o PEG.

4.5 - Erro sistemático (BIAS), devido a técnica de separação

As doses obtidas utilizando a separação magnética com partículas produzidas no IPEN e aquelas obtidas com as outras três formas de separação são apresentadas nas figuras

44, 45 e 46 distribuídas em torno de uma reta de identidade.

A comparação partículas SCIPAC versus partículas IPEN forneceu a seguinte regressão linear:

Inclinação = 0,753

Interceção = 0,754

Coefficiente de correlação = 0,998 (P < 0,001).

Número de amostras = 38.

Observa-se que as partículas magnéticas produzidas no IPEN, tendem a superestimar os valores do hTSH presentes nos soros, quando comparados com a SCIPAC.

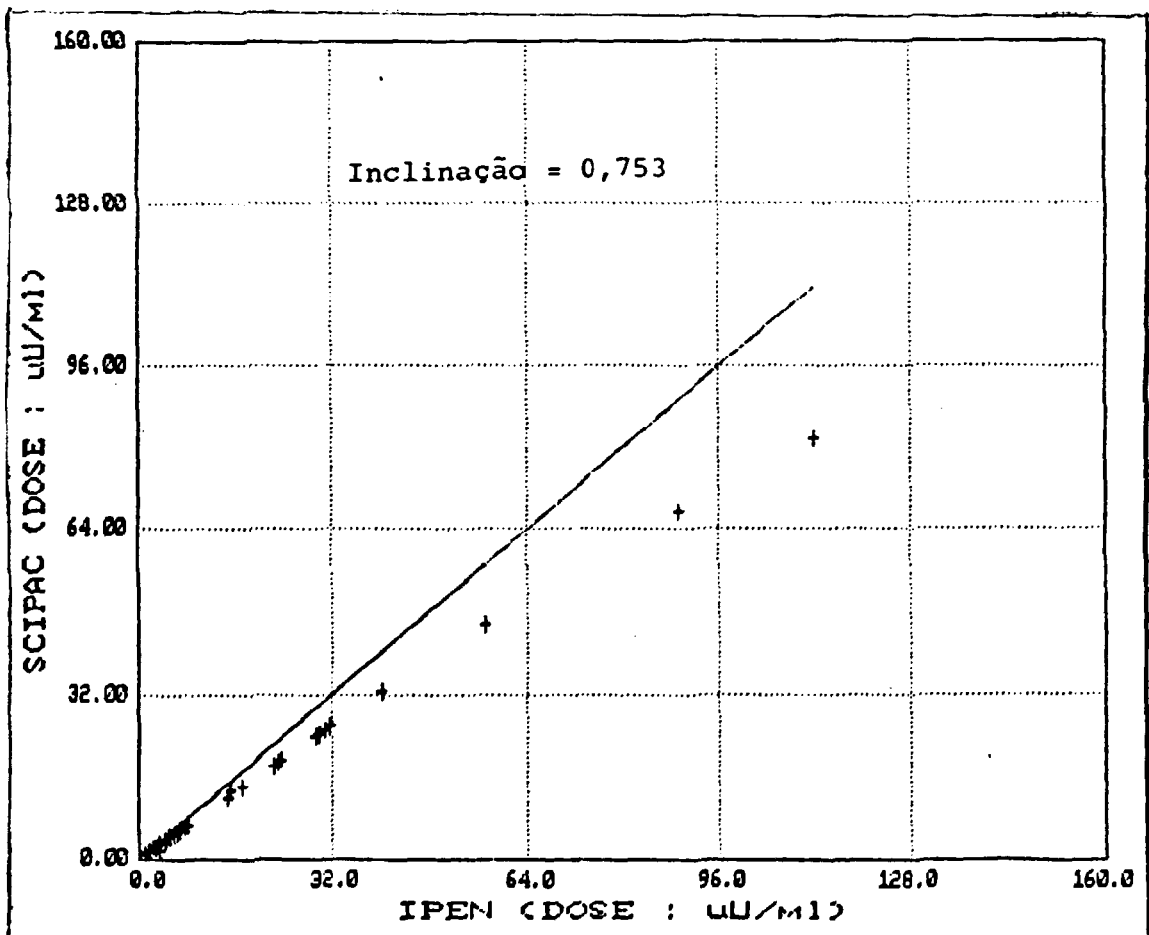


Figura 44: Distribuição em torno da reta de identidade dos dados obtidos nos radioimunoensaios de hTSH em fase magnética, com partículas produzidas no IPEN e importadas.

A comparação segundo Anticorpo versus partículas
IPEN forneceu a seguinte regressão linear:

Inclinação = 1,237

Interceção = - 2,246

Coefficiente de correlação = 0,991 (P < 0,001).

Número de amostras = 38.

Estes dados comprovam que existe correlação entre os dois métodos nos níveis mais baixos de concentração do hTSH e talvez uma superestimação dos valores de doses mais elevadas, quando separados com o 2º Anticorpo.

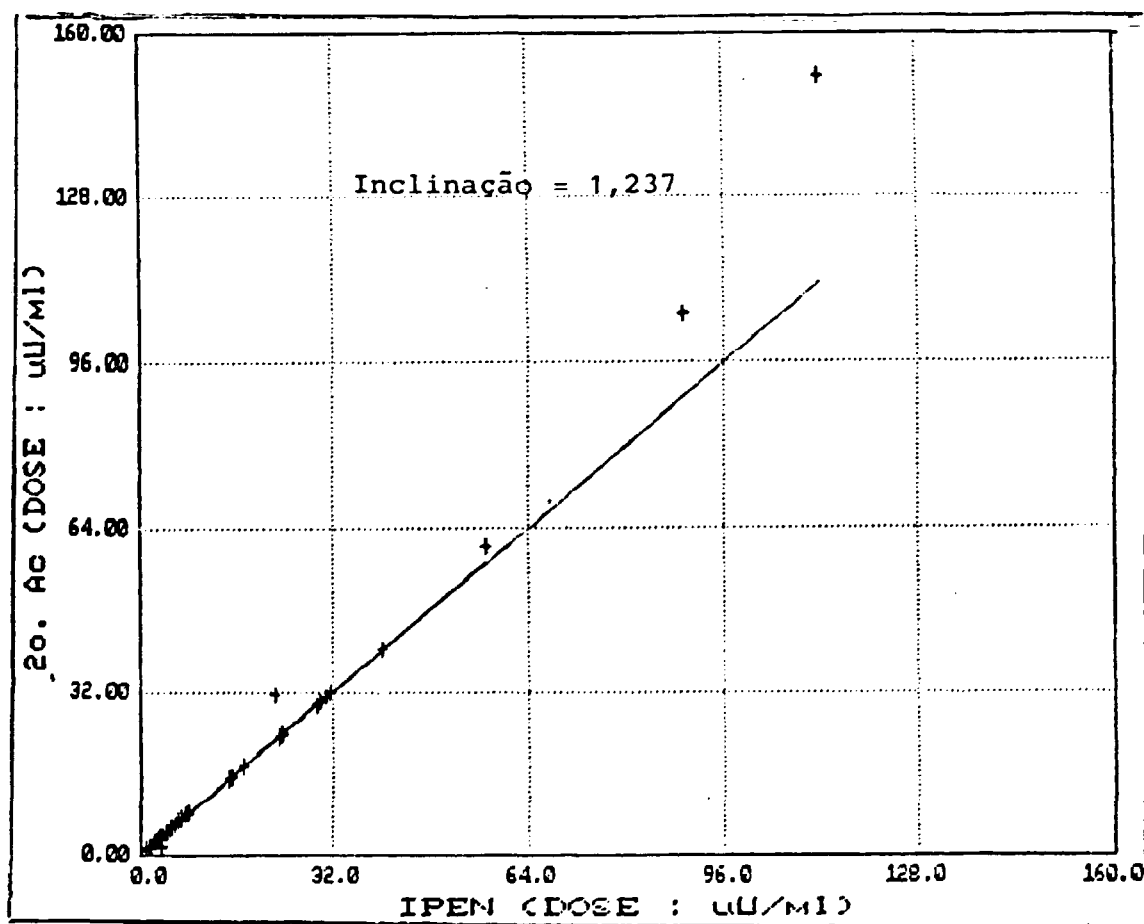


Figura 45: Distribuição em torno da reta de identidade dos dados obtidos nos radioimunoensaios de hTSH por fase magnética com partículas produzidas no IPEN e por fase líquida utilizando o 2º Anticorpo produzido no IPEN.

A comparação PEG versus partículas IPEN forneceu a seguinte regressão linear:

Inclinação = 0,848

Interceção = 0,559

Coefficiente de correlação = 0,971 (P < 0,001).

Número de amostras = 38.

Estes dados comprovam uma pequena superestimação dos valores de hTSH com a partícula magnética, principalmente nos níveis mais baixos, tendendo a aumentar nos valores mais elevados.

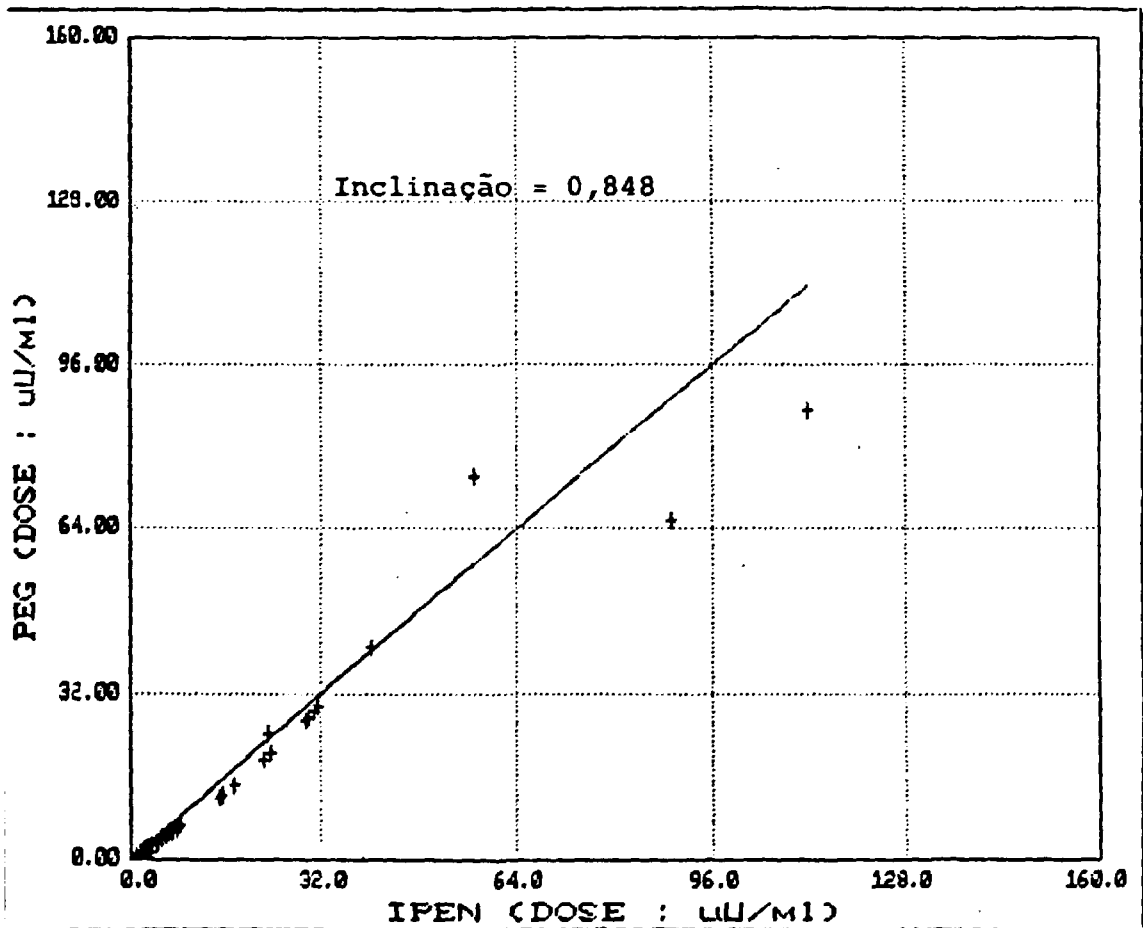


Figura 46: Distribuição em torno da reta de identidade dos dados obtidos nos radioimunoensaios de hTSH por fase magnética com partículas produzidas no IPEN e por fase líquida com o PEG 6.000.

As doses obtidas utilizando a separação magnética ou partículas importadas e aquelas obtidas com os dois métodos de separação por fase líquida são apresentadas nas figuras 47 e 48 distribuídas em torno de uma reta de identidade.

A comparação 2º Anticorpo versus partículas SCIPAC forneceu a seguinte regressão linear:

Inclinação = 1,629

Interceção = - 3,332

Coefficiente de correlação = 0,984 (P < 0,001).

Número de amostras = 38.

Estes dados demonstraram a superestimação dos valores com a separação líquida, tendendo a aumentar nos valores mais elevados de hTSH.

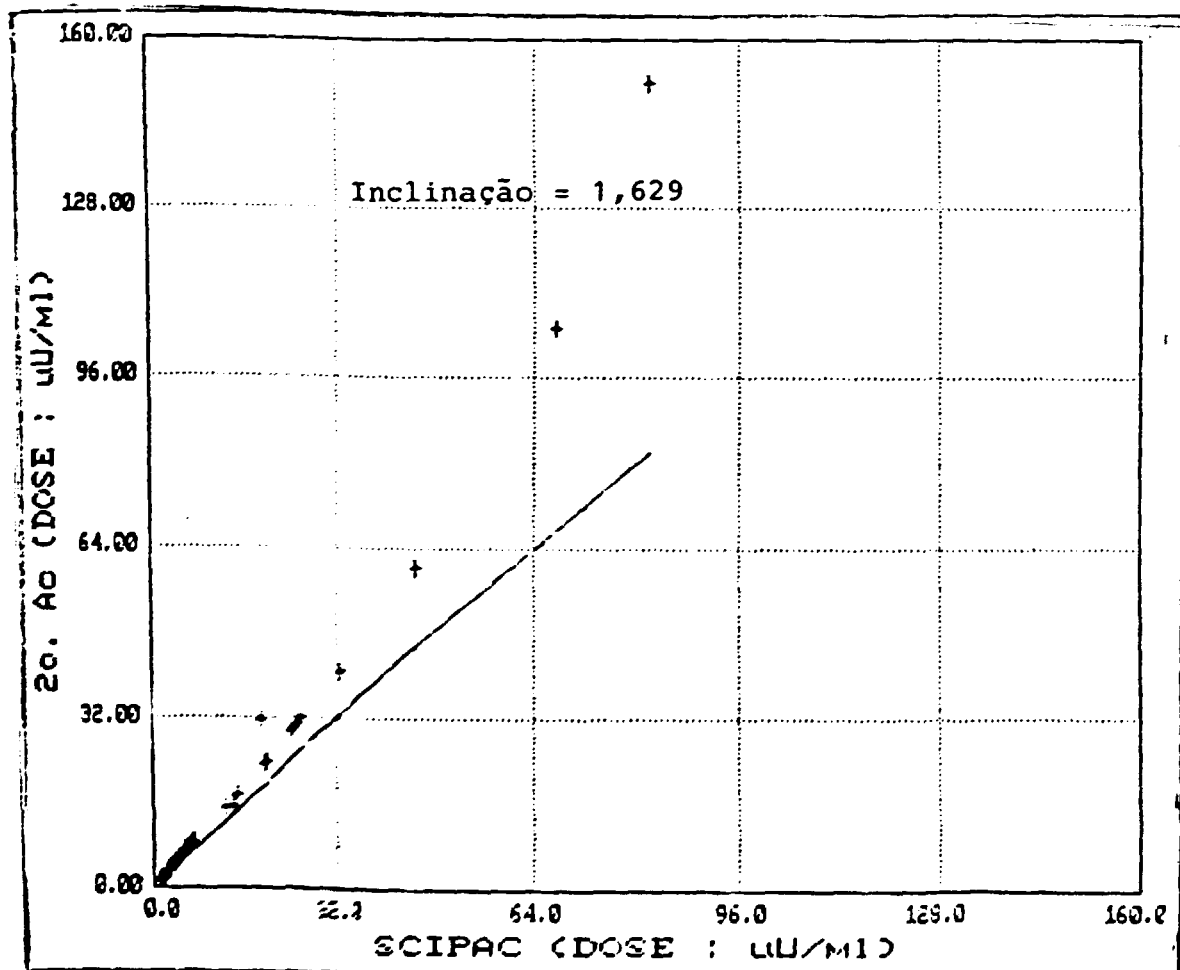


Figura 47: Distribuição em torno da reta de identidade dos dados obtidos nos radioimunoensaios de hTSH por fase magnética com partículas importadas e por fase líquida com o 2º Anticorpo produzido no IPEN.

A comparação PEG versus partículas SCIPAC forneceu a seguinte regressão linear:

Inclinação = 1,130

Interceção = - 0,298

Coefficiente de correlação = 0,977 (P < 0,001).

Número de amostras = 38.

Estes dados mostram uma tendência de superestimar os valores de hTSH, a partir de concentrações médias com o Polietilenoglicol.

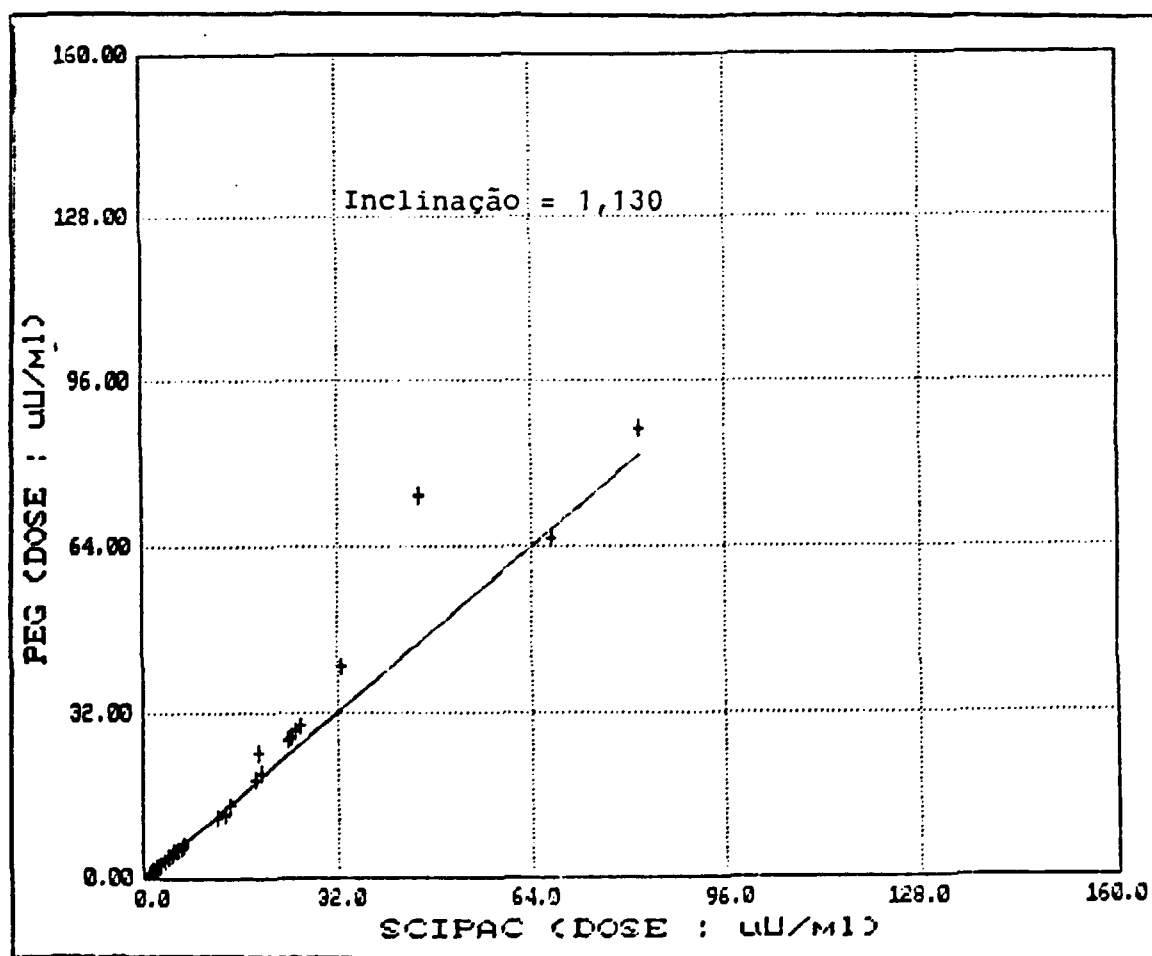


Figura 48: Distribuição em torno da reta de identidade dos dados obtidos nos radioimunoensaios de hTSH por fase magnética com partículas importadas e por fase líquida com o PEG 6.000.

As doses obtidas utilizando as duas separações em fase líquida são apresentadas na figura 49 distribuídas em torno de uma reta de identidade.

A comparação PEG versus 2º Anticorpo forneceu a seguinte regressão linear:

Inclinação = 0,661 Interceção = 2,580

Coefficiente de correlação = 0,945 (P < 0,001).

Número de amostras = 38.

Estes dados indicam um "BIAS" elevado, que parece produzir valores maiores com a técnica do 2º Anticorpo. Ao nosso ver, porém, a baixa precisão da técnica de separação com PEG, deve ter aumentado a flutuação dos resultados especialmente nas doses altas.

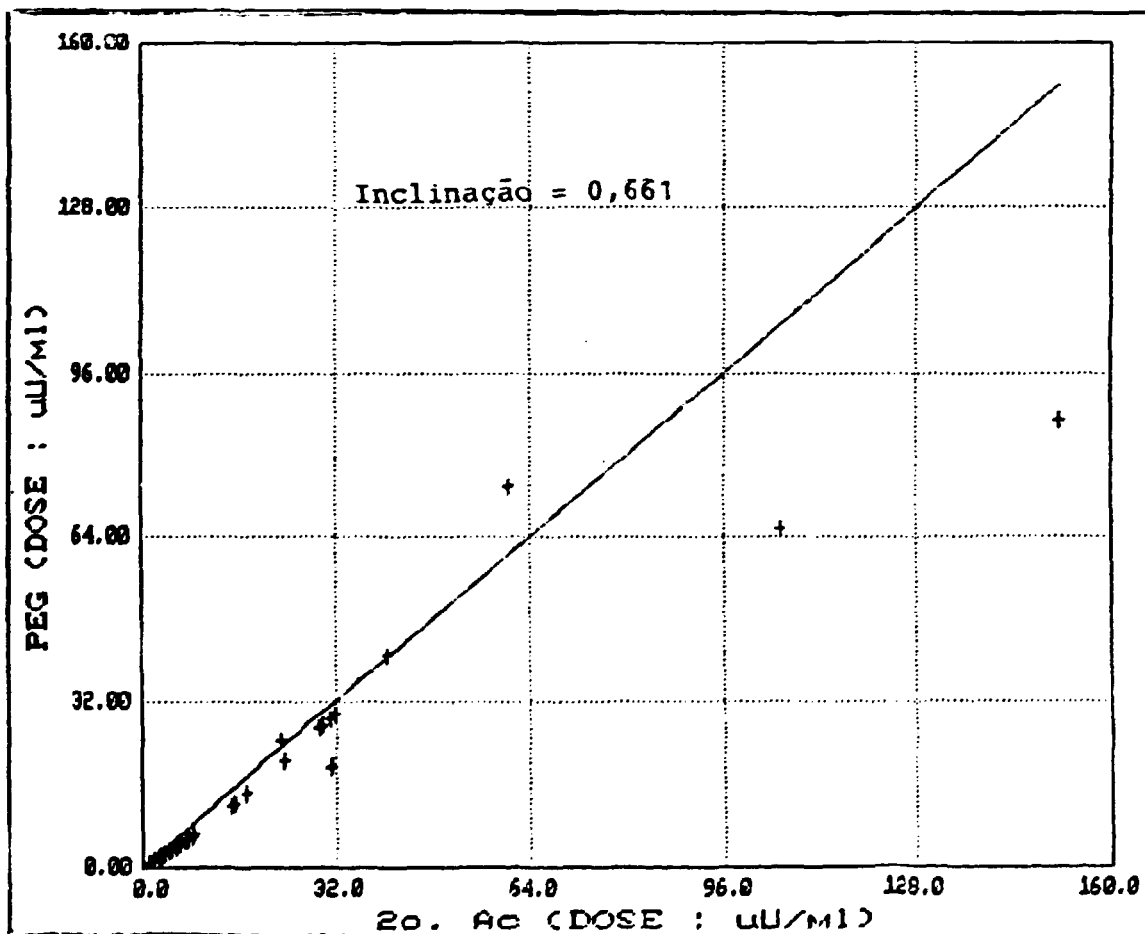


Figura 49: Distribuição em torno da reta de identidade dos dados obtidos nos radioimunoensaios de hTSH, comparando-se os dois métodos de separação em fase líquida.

Em conclusão, este estudo sobre o "BIAS", relacionado com as várias técnicas de separação, parece indicar uma constante tendência negativa, ligada à utilização da partícula importada. Isto acontece de maneira bem evidente, quando é comparada à partícula IPEN e também ao 2º Anticorpo. Quando comparada com o PEG, a partícula importada parece introduzir um "BIAS" com valores menores. Já o sistema PEG, por sua vez, parece ter tendência a um "BIAS" negativo ou pelo menos com maior imprecisão. Este resultado poderia indicar, em analogia com os resultados obtidos nos P.P., uma certa alteração ou diferença, relacionada com o anticorpo acoplado à partícula importada.

A partícula IPEN e o 2º Ac parecem ser as técnicas menos influenciadas pelo "BIAS". Na comparação entre elas e também entre o PEG e o 2º Ac, este último apresenta, geralmente, "BIAS" positivo, ou seja, valores maiores. Lembramos que o 2º Ac é o mesmo utilizado no acoplamento da partícula IPEN, o que poderia explicar o "BIAS" positivo apresentado pela partícula IPEN com relação à partícula importada.

5 - DISCUSSÃO

A realização deste trabalho de tese, tem duas finalidades principais. A primeira está especialmente relacionada ao desenvolvimento do projeto da Agência Internacional de Energia Atômica, que visa a padronização de técnicas de radioensaios, com a produção autônoma dos reagentes necessários para a detecção do hipotiroidismo neonatal na América Latina (Projeto Arcal).

O laboratório do IPEN-CNEN/SP onde este trabalho foi realizado, coordena as atividades deste projeto no Brasil e seu campo de maior atuação é especialmente ligado à preparação de padrões internacionais de hTSH e ao estudo e preparação de anticorpos em fase sólida. Vale a pena lembrar que até o momento atual a situação do "screening" para hipotiroidismo neonatal na América Latina é simplesmente desesperadora, pois apenas um país (Cuba), realiza esta tarefa de maneira plenamente satisfatória. Dois ou três países, incluindo o Brasil, provavelmente analisam apenas 10% dos recém-nascidos e todos os outros praticamente não desenvolveram nenhum esquema de controle. Lembramos também, que em algumas regiões (Bolívia, Equador e Peru), existem bolsões de elevada incidência de bócio endêmico (até 80% da população), sem terem ainda dados efetivos com relação à incidência do hipotiroidismo e conseqüente cretinismo.

Com relação a esta primeira finalidade, o trabalho de padronização de um sistema de separação em fase sólida, mais independentemente possível da importação de reativos de custo exorbitante, tornou-se um dos objetivos principais e talvez o único que não foi solucionado pelo programa ARCAL. Ainda de acordo com os últimos levantamentos realizados, a utilização de um esquema IRMA de hTSH para a detecção do hipotiroidismo neonatal na América Latina, tem o custo do sistema de separação em fase sólida, provavelmente maior que 80% do custo total dos reagentes.

Por estas razões a construção de um separador magnético nacional, seus testes e controle de qualidade, a escolha e padronização de um método químico de acoplamento de anticorpos à celulose magnetizada e todos os testes que comprovam a qualidade da partícula obtida, se tornaram fundamentais ao desenvolvimento do programa.

A segunda finalidade, que tem aspectos mais teóricos, cujo impacto prático a nível intra e interlaboratorial é também fundamental, é o estudo da precisão da técnica desenvolvida, pois da mesma forma que há esquemas de ensaios (RIE, IRMA, etc.), que vêm sendo utilizados há mais de 20 anos, há técnicas de separação também conhecidas a décadas e utilizadas mais ou menos arbitrariamente, julgando seu desempenho na base de parâmetros de avaliação imediata; ligação específica e inespecífica, inclinação da curva, ED_{50} , determinação automática dos perfis de precisão, baseados em estatísticas insuficientes. Poucas vezes realizamos ou vimos realizar um verdadeiro estudo estatístico significativo de comparação entre técnicas de separação diferentes, mediante a constru-

ção dos perfis de precisão. E é sabido que esta é a única maneira válida de avaliar o impacto que a introdução de uma modificação técnica tem no desempenho de um ensaio. Assim esta segunda finalidade, que só tem validade plena quando é realizada com os reativos específicos que foram preparados (considerando-se, portanto, as limitações e imperfeições destes mesmos reativos), devia ser necessariamente alcançada, juntamente com a primeira.

A construção de um separador magnético nacional foi realizada com pleno êxito. Como podemos observar pelos resultados apresentados, seu desempenho é absolutamente idêntico ao do produto importado. Além dos dados apresentados nesta tese, devemos lembrar à sua utilização com sucesso na realização de um curso internacional no laboratório da TBM (IPEN), quando estes separadores foram utilizados por grupos de alunos no radioimunoensaio dos hormônios: hTSH, hGH, hLH, hFSH e hPRL. O seu custo, baseado na aquisição de todos materiais nacionais, de fácil obtenção, foi calculado em US\$ 30, por exemplar, contra aproximadamente US\$ 105, do produto importado. Obviamente mais trabalho deverá ser realizado, no sentido de melhorar sua estética e transportabilidade, estes aspectos, porém, fogem do presente trabalho e dos recursos disponíveis. Sabemos, porém, que o laboratório coordenador do Projeto ARCAL chileno, que juntamente com outros, recebeu por doação um protótipo deste separador, já o aperfeiçoou, chegando a implantar rotineiramente à sua produção.

A preparação da partícula magnética (2º Anticorpo produzido em nosso laboratório, acoplado à celulose magnetizada, adquirida à SCIPAC Limited, Londres, se constituiu na

principal realização técnica do presente trabalho. Como podemos observar na apresentação dos resultados, várias técnicas e várias partículas foram pesquisadas. Das três técnicas de acoplamento mais comumente usadas e que utilizam brometo de cianogênio, carbonildiimidazol (CDI) e metaperiodato de sódio, estas duas últimas foram testadas e somente após algumas modificações introduzidas na técnica do metaperiodato foi possível obtermos resultados satisfatórios. Também foram testados vários tipos de partículas de celulose magnetizada: uma com 50% de Fe_3O_4 (M 100), uma com 25% de Fe_3O_4 (M 104) e uma com 12,5% de Fe_3O_4 (M 108), cujos dados não foram apresentados. A M 104 foi a partícula que geralmente apresentou melhores dados, especialmente com relação aos rendimentos e aos valores de ligação inespecífica, sendo também possível a utilização da partícula M 100, com resultados e desempenho satisfatórios. O valor das ligações específicas alcançou, a maioria das vezes, aqueles típicos da partícula importada, enquanto as ligações inespecíficas, foram geralmente um pouco maiores. O estudo subsequente sobre a precisão mostrará, porém, que este fato não teve particular influência negativa.

Com relação aos rendimentos dos acoplamentos, podemos afirmar que, introduzindo-se cuidados especiais nas manualidades, foi possível alcançar valores superiores a 70%, contra os valores inferiores a 50% conseguidos inicialmente, melhorando, portanto, a economicidade da preparação.

No que se refere a estabilidade das partículas, podemos afirmar que os produtos IPEN, ainda não são tão estáveis quanto o produto importado, pois após 50 dias do acoplamento, apresentaram perdas de aproximadamente 40% nas ligações es-

pecíficas. Diminuições paralelas no inespecífico permitiram, porém, a manutenção do desempenho da partícula no ensaio. Considerando a importância da obtenção de um produto perfeitamente estável, estamos realizando estudos neste sentido sobre as condições de estocagem, as características do 29 Anticorpo e o tipo de reação de acoplamento usados.

Uma análise completa da qualidade da partícula magnética produzida durante este trabalho, não pode prescindir de fundamentos de caráter econômico. Se considerarmos como técnica de referência a que utiliza o 29 Anticorpo em fase líquida, observamos que o custo deste reagente de separação é da ordem de US\$ 0.11 por tubo. Adquirindo a celulose magnetizada (SCIPAC) e acoplando o antissorro produzido em nosso laboratório, chegamos a um custo de US\$ 0.025 por tubo, sem considerar o fato que esta técnica permite excluir o custo de aquisição e manutenção de centrífugas refrigeradas. Se considerarmos ainda, o custo de US\$ 0.09 por tubo, relativo ao emprego da partícula magnética importada já acoplada ao anticorpo, a partícula por nós sintetizada, ainda é consideravelmente mais econômica, além do fato de evitar constantes importações de produtos com validade limitada.

Lembramos enfim, que o domínio da tecnologia de acoplamento, permitiu à preparação de outros tipos de produtos, entre os quais o 19 Anticorpo, policlonal, anti hTSH acoplado à fase magnética e utilizado no IRMA deste hormônio. Os dados obtidos com este tipo de anticorpo por pesquisadores do IPEN, só foram possíveis graças aos conhecimentos adquiridos com este primeiro estudo.

Na preparação desta partícula magnética não deve ser

subestimada a importância do 2º Anticorpo produzido no IPEN e cuja qualidade, obviamente, é um fator indispensável para o bom funcionamento da fase sólida. Um estudo realizado no presente trabalho, mostrou que seu título é consideravelmente superior ao título do produto importado da Radioassay. De fato, esta qualidade do 2º Anticorpo IPEN pode ter sido responsável pelo desempenho aparentemente melhor da partícula IPEN junto à partícula importada.

A construção e análise dos perfis de precisão, relativos às quatro formas de separação, foi desenvolvida em quatro níveis diferentes. O primeiro nível foi aquele apresentado na tabela XII o qual utilizou duplicatas da curva padrão e, portanto, uma estatística sumariamente limitada com o programa de computação RIAKALK. O segundo e terceiro níveis, foram as técnicas manuais de construção dos perfis, realizados em perfeito acordo com as recomendações de R.P. Ekins, com significância estatística adequada, utilizando em um caso decuplicatas de cada um dos 10 pontos da curva padrão ($n = 100$) e no outro caso duplicatas da curva padrão, dos soros controle (baixo, médio e alto) e de soros desconhecidos ($n = 100$). O quarto nível foi a repetição do cálculo dos mesmos perfis, agora utilizando o programa RIAKALK, nos mesmos dados estatísticos ($n = 100$).

Uma primeira consideração, que pode ser feita, analisando todos estes dados, é que o processamento automático dos dados (Programa de Computação RIAKALK), produz resultados bem diferentes do processamento manual. No caso do processamento automático de curvas em duplicatas (tabela XII), portanto, com estatística muito limitada, a precisão de todos

os diferentes esquemas de ensaio, é bem superior à precisão calculada manualmente. Existe pouca discriminação entre as técnicas, ou seja, a precisão do 2º Anticorpo é praticamente a mesma obtida com o Polietilenoglicol, enquanto que as duas técnicas magnéticas, mais precisas para doses altas, não parecem apresentar grandes diferenças. As duas têm um desempenho melhor com relação às técnicas não magnéticas e entre as duas o produto IPEN, demonstra ser um pouco melhor. Passando ao processamento automático dos dados, com estatística mais rica, no caso das decuplicatas da curva padrão há um elevado achatamento dos resultados. Todas as técnicas apresentam uma enorme precisão: praticamente no intervalo de 1 a 300 $\mu\text{U/ml}$ e não há discriminação entre os vários métodos de separação. Isto nos sugere muita cautela.

O primeiro resultado com estatística limitada pode até parecer real e apresenta uma certa discriminação. Podemos especular que a maior precisão obtida é real e depende do ajuste realizado pelo programa e que obviamente não é feito nas técnicas manuais? Mas aqui surge outro questionamento: maior riqueza estatística no processamento automático, deve necessariamente levar a uma maior precisão e ao achatamento dos resultados relativos as diferentes técnicas? Não nos parece. Maior riqueza estatística deveria ao nosso ver, evidenciar melhor, qual é a técnica mais precisa. Estes resultados que sugerem um coeficiente de variação menor que 10% até doses de 300 $\mu\text{U/ml}$, para um PIE de hTSH, nos parecem francamente irrealis, especialmente quando constatamos que o intervalo é o mesmo para as quatro formas de separação.

A nossa cautela na utilização dos dados obtidos pelo

processamento automático de dados, após estas considerações, é portanto, ainda maior e sugerimos a mesma cautela a todos aqueles que usam "software" fechados, a maioria das vezes, sem saber como é montada a estatística. A mesma cautela, recomendada com relação à precisão, deve ser utilizada no cálculo da sensibilidade. Podemos de fato observar uma sensibilidade calculada manualmente pelo método descrito por Rodbard (69), que é 4 a 6 vezes maior que aquela calculada pelo programa computacional e onde, aparentemente, não é realizado nenhum teste de significância, mas somente escolhida aquela dose, que permita uma precisão cujo valor é fixado pelo perfil assim construído.

Nossa análise da precisão, comparando as quatro formas de separação, será portanto, baseada especialmente na construção manual dos referidos perfis em parte confirmada pelo processamento automático dos dados somente no caso da utilização de duplicatas de "n" desconhecidos. Como já foi mencionado em alguns comentários, realizados no capítulo anterior, houve algum resultado diferente nos dois esquemas de análise baseados em decuplicatas da curva padrão ou em duplicatas de "n" desconhecidos. Nos dois esquemas porém, a partícula IPEN apresentou os maiores intervalos e a maior precisão, enquanto que a partícula importada e o 2º Anticorpo apresentaram dados quase idênticos. A técnica de separação que utiliza o PEG e que nos dois casos apresentou a pior precisão para as doses altas, teve resultados contraditórios para as doses baixas. No primeiro esquema sua precisão foi a melhor entre todas as técnicas, enquanto que no segundo, foi a pior. Podemos arriscar alguma explicação? Com os dados

disponíveis é muito arriscado, porém vale a pena tentar.

Claramente, por alguma razão, a análise baseada nas duplicatas de "n" desconhecidos, deu resultados mais confiáveis, especialmente se considerarmos os RER relativos. Os coeficientes de correlação destas relações erro-resposta, foram claramente melhores neste segundo caso. A técnica mais suspeita (o PEG), no primeiro caso não apresentou praticamente correlação nenhuma. Além disto, por dados interlaboratoriais e da literatura, como também, considerando o valor de sua ligação inespecífica, é sabido que a técnica de separação com o PEG é uma das mais imprecisas. Existe porém, a pequena probabilidade, que no primeiro esquema, a precipitação com o PEG, tenha funcionado com alta reprodutibilidade, devido a sua melhor controlabilidade e altos valores de contagem.

Mas a preocupação maior de nossa análise, não é tanto a precisão da técnica de separação por PEG, mas da técnica em fase magnética, que utilizou a partícula IPEN. Porque uma precisão claramente maior do que aquela da análoga partícula importada, considerando que tanto as ligações específicas quanto as inespecíficas são em favor da partícula importada? Porque o estudo realizado com relação ao "BIAS", parece indicar um desempenho mais duvidoso da partícula importada? Existem duas possibilidades: a natureza do anticorpo acoplado do IPEN (melhor título e avidéz), ou o menor tempo decorrido, entre o acoplamento e o ensaio da partícula IPEN. Existe também, a possibilidade de ordem psicológica e que frequentemente é muito difícil de ser evitada e identificada: o fato que o experimentador, que é também o sintetizador da

partícula, dedique maiores cuidados ao seu reagente. De qualquer forma os dados não são tão diferentes, que possam gerar grandes dúvidas na utilização prática destas técnicas.

A técnica de separação em fase magnética, além de ser mais econômica e de eliminar a centrifugação, certamente não proporciona precisão inferior as outras duas técnicas tradicionais: muito provavelmente, permite uma precisão e um intervalo de determinação maiores. Considerando que até o produtor (SCIPAC), declara uma validade limitada para as suas partículas, é recomendável usar produtos recém-acoplados e que, obviamente, satisfaçam os valores de ligações específicas e inespecíficas, que não sejam, respectivamente inferiores a 30% e superiores a 1 a 2 %.

A qualidade do anticorpo a ser acoplado é de extrema importância e deve ser testada como foi neste trabalho, mediante ensaio tradicional em fase líquida.

6 - CONCLUSÃO

Em conclusão, as duas finalidades principais propostas neste trabalho, foram cumpridas.

Foi padronizada uma técnica de preparação de reagentes de extremo interesse para a separação de radioimunoensaios e ensaios imunorradiométricos em fase sólida, que representa maior economia, independência e praticidade.

A análise dos perfis de precisão das técnicas de separação empregadas, calculados manualmente, se mostrou extremamente útil e de grande validade. Não se recomenda, portanto, a utilização em trabalhos de pesquisa, do processamento automático de dados, que não tenha sido previamente revalidado, mediante análises manuais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABRAHAM, G.E. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β . J. Clin. Endocrinol., 1969, 29, 866-870.
02. AL-ABDULA, I.H., MELLOR, G.W., CHILDERSTONE, M.S. SIDKI, A.M. and SMITH, D.S. Comparison of three different activation methods for coupling antibodies to magnetizable cellulose particles. J. Immunol. Meth., 1989, 122, 253-258.
03. AL-DUJAILI, E.A.S., FORREST, G.C., EDWARDS, C.R.W. and LANDON, J. Evaluation and application of magnetizable charcoal for separation in radioimmunoassays. Clin. Chem., 1979, 25/8, 1402-1405.
04. AXEN, R., PORATH, J. and ERNBACK, S. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature, 1976, 214, 1302-1304.
05. BETHELL, G.S., AYERS, J.S., HANCOCK, W.S. and HEARN, M. T.W. A novel method of activation of cross-linked agarose with 1.1' carbonyldiimidazole which gives a matrix for affinity chromatography devoid of additional charged groups. J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-2574.

06. BINDEK, M.A. and ODELL, W.D. Use of dextran-coated free hormonal: A critique. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1973, 36, 303-310.
07. BOLTON, A.E. and HUNTER, W.M. The use of antisera covalently coupled to agarose, cellulose and sephadex in radioimmunoassay systems for proteins and haptens. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 329, 318-330.
08. BORGHI, V.C., LIN, L.H., SILVA, S.R. e MORAES, V.K. Avaliação do RIAKALK: um programa para microcomputadores de análise de dados de radioimunoensaio. Trabalho apresentado na 42ª Reunião da SBPC, Porto Alegre, 1990.
09. BORGHI, V.C., LIN, L.H., SILVA, S.R. e BELLINI, M.H. Producción de reactivos biológicos de radioimunoanálisis: segundo antisuero. Trabalho apresentado no II Congresso Latinoamericano de Biotecnología, Havana, 1990.
10. CAIS, M. and CHIMONI, M. A novel system for mass transport through selective barriers in non-centrifugation immunoassays. Ann. Clin. Biochem, 1981, 18, 324-329.
11. CATT, K.T. and REGEAR, G.W. Solid phase radioimmunoassay in antibody coated tubes. Science, 1967, 158, 1570-1572.
12. CHAPMAN, R.S., SUTHERLAND, R.M. and RATCLIFFE, J.G. Application of 1,1' carbonyldiimidazole as a rapid practical method for the production of solid-phase immunoassay reagents. Trabalho apresentado no Radio-

immunoassay and Related Procedures in Medicine (IAEA), Berlin, 1977.

13. CHAPMAN, R.S. and RATCLIFFE, J.G. Covalent linkage of antisera to microparticulate cellulose using 1.1' carbonyldiimidazole: a rapid practical method with potential use in solid-phase immunoassay. Clin. Chim. Acta, 1982, 118, 129-134.
14. CHARD, T. Requiriments for a binding assay-separation of bound and free ligand. In: T.S. Work and E. Work (Eds.), Laboratory techniques in biochemistry and molecular medicine, Amsterdam, Excerpta Medica, 1978.
15. CHARD, T. Ammonium sulphate and polyethylene glycol as reagent to separate antigen-antibody complexes. In: H. Van Vunakis and J.J. Langoni (Eds.), Methods in Enzymology, New York, Academic Press, 1980.
16. CREIGHTON, W.D., LAMBERT, P.H. and MIESCHER, R. Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethyleneglycol. The Journal of Immunology, 1973, 111, n^o 4. 1219-1226.
17. DAUGHADAY, W.H. and JACOBS, L.S. Methods of separation antibody bound from free antigen. In: W.D. Odell and W.H. Daughaday (Eds.), Principles of Competitive Protein Binding Assay, Philadelphia, Lippincote Co. 1972.

18. DAWES, C. and Gardner, J. Radioimmunoassay of digoxin employing charcoal entrapped in magnetic polyacrylamide particles. Clin. Chim. Acta, 1978, 86, 353-356.
19. DE HERTOOGH, R., WOLTER, R., VAN VLLEET, G. and VAUKRIEKEN, L. Serum gonadotropins levels in childhood: critical comparison between immunoradiometric assays and radioimmunoassays. Acta Endocrinol., 1989, 121, 141-146.
20. DE JONG, P.J. Simple method for preparation of antibody-enzyme conjugates for enzyme-linked immunosorbent assays. J. Clin. Microbiol. 1983, 17, 928-935.
21. DEN HOLLONDER, F.C., SHUURS, A. and VAN HELL, H. Radioimmunoassay for human gonadotrophins and insulin employing a "double-antibody solid-phase" technique. J. Immunol. Meth., 1972, 01, 247-262.
22. DESBUQUOIS, B. and AURBACH, G.D. Use of polyethyleneglycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1971, 33, 723-738.
23. DONALD, R.A. Application of coated charcoal separation method for the radioimmunoassay of plasma corticotropin. J. Endocrinol., 1968, 41, 499-508.
24. DONINI, S. and DONINI, P. Radioimmunoassay employing polymerised antisera. Acta Endocrinol., 1968, 63, suppl. 142, 257-278.

25. EDWARDS, R. The development and use of PEG assisted second antibody precipitation as a separation technique in radioimmunoassays. Trabalho apresentado no Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine (IAEA). Berlin, 1977.
26. EKINS, R.P. The estimation of thyroxin in human plasma by an eletrophoretic technique. Clin. Chim. Acta, 1960, 5, 457-464.
27. EKINS, R.P., NEWMAN, G.B. and O'RIORDAN, J.L.H. Saturation Assays. In: J.H.Mc Arthur and T. Colton (Eds.), Statistics in Endocrinology, Cambridge, MIT Press, 1970.
28. EKINS, R.P. Separation Method, charcoal. In: M. Marcoulies (Ed.), Protein and Polypeptide Hormones, Amsterdam, Excerpta Medica, 1969.
29. EKINS, R.P. The precision profile: its use in assay, designe, assessment and quality control. In: W.M. Hunter and J.E.T. Carrie (Eds.), Immunoassay for Clinical Chemistry, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1983.
30. FORREST, G.C. and RATTLE, S.J. Magnetic particle radioimmunoassay. Trabalho apresentado no Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine (IAEA), Berlin, 1977.
31. GIMBO, E.K., RIBELA, M.T.C.P., BORGHI, V.C., SCHWARZ, I.,

- MORGANTI, L., ARAÚJO, E.A. and BARTOLINI, P. Small-scale extraction and radioiodination of human hormones for the substitution of imported radioimmunoassay reagents. Trabalho apresentado no 2º Congresso Geral de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, 1988.
32. GOLDMAN, S.J. Radioimmunoassay: review of basic principles. Sem. Nucl. Med., 1975, 5:1-28.
33. GUESDON, J. L. and AURAMEAS, S. Magnetic solid-phase enzyme-immunoassay. Immunochemistry, 1977, 14, 443-447.
34. GUREVICH, A.E., KUZOVLEVA, O.B. and TUMANOVA, A.E. Production of protein-cellulose complexes (immunosorbents) in the form of suspensions able to build great amounts of antibodies. Biokhimiya, 1961, vol. 26, nº 5, 934-942.
35. GUTHRIE, R.D. The dialdehydes from the periodate oxidation of carbohydrates. Advan. Carbohydr. Res., 1961, 16, 105-112.
36. HALES, C.N. and RANDLE, P.J. Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate. Biochem. J., 1963, 88, 137-146.
37. HEARN, M.T.W., BETHELL, G.S., AYRES, J.S. and MANCOCK, W.S. Application of 1,1' carbonyldiimidazole activated agarose for the purification of proteins. J. Chromatogr., 1979, 185, 463-470.

38. HERBERTI, V., LAN, K.S., GOTTLIEB, C.W. and BLEISCHEV, S.J. Coated charcoal immunoassay of insulin. J. Clin. Endocrinol., 1965, 25, 1375-1384.
39. HERBERTI, V. Coated charcoal separation of free labeled hormone from hormone bound to antibody. In: M. Margoulies (Ed.), Protein and Polypeptide Hormones, Amsterdam, Excerpta Medica, 1969.
40. HERSH, L.S. and YAVERBAUM, S. Magnetic solid-phase radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta, 1975, 63, 69-72.
41. HUNTER, W.M. and GRECWOOD, F.C. Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, 1962, 194, 495-496.
42. HUNTER, W.M. and Ganguli, P.C. The separation of antibody bound from free antigen. In: K.E. Kirkham and W.M. Hunter (Eds.), Radioimmunoassay Methods, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971.
43. ITHAKISSIOS, D.S. and KUBIATOWICZ, D.O. Use of protein containing magnetic microparticles in radioassay. Clin. Chem., 1977, 23, 2072-2079.
44. JACOBS, H.S. Use of activated charcoal in the radioimmunoassay of human growth hormone in plasma. J. Clin. Pathol., 1969, 22, 710-717.
45. KAMEL, R.S. and GARDNER, J. Preparation of ^{125}I labelled methotrexate and its use in a magnetizable particle

solid-phase radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta, 1978, 89, 363-370.

46. KAMEL, R.S., LANDON, J. and SMITH, D.S. Novel ^{125}I labelled nortatyline derivatives and their use in liquid phase or magnetizable solid-phase second antibody radioimmunoassays. Clin. Chem., 1979, 25, 1997-2002.
47. KARONEW, S., MORSKY, P., SIREW, M. and SENDERLING, W. An enzymatic solid-phase method for tracer iodination of proteins and peptides with ^{125}I Iodine. Anal. Biochem., 1975, 67, 1-10.
48. KONNINCKX, P., BOUILLON, R. and DE MOOR, P. Second antibody chemically linked to cellulose for the separation of bound and free hormone. An improvement over soluble second antibody in gonadotropin radioimmunoassay. Acta Endocrinol., 1976, 81, 45-53.
49. KUBAL, B.S., GODBOLE, S.S. and D'SOUZA, S.P. Preparation and characterization of magnetic hen egg white heads, containing coimmobilized glucose oxidase, magnetite and MnO_2 . Indian Journal of Biochemistry and Biophysic., 1986, 23, 240-241.
50. McCONWAY, M.G., BIGGART, E.M. and CHAPMAN, P.S. Performance of the two-site immunoradiometric assay for serum thyroid-stimulating hormone - Effects of changes in solid-phase matrix and antibody coupling chemistry. Journal of Immunological Methods, 1987, 104, 87-92.

51. MARGESSI, R.D., LANDON, J., POURFARZANCH, M. and SMITH, D.J. Solid-phase fluoroimmunoassay of human albumin in biological fluids. Clin. Chim. Acta, 1978, 89, 455-460.
52. NILSSON, K. and MOSBACH, K. p-toluenosulfonyl chloride as a activating agent of agarose for the preparation of immobilized affinity ligands and proteins. Eur. J. Biochem., 1980, 112, 397-402
53. NILSSON, K. and MOSBACH, K. Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulfounyl chlorides. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1981, 102, 449-457.
54. NUSTAD, K., JOHANSEN, L., UGELSTAD, J., ELLINGSEN, T. and BERGE, A. Hydrophilic monodisperse particles as solid-phase material in immunoassays, comparison of shell and core particles with compact particles. European Surgical Research, 1984, 16, suppl. 2, 08-87.
55. NYE, L., FORREST, G.C., GREENWOOD, H., GARDNER, J.S., JAY, R., ROBERTS, J.R. and LANDON, J. Solid-phase magnetic particle radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta, 1976, 69, 387-396.
56. ODELL, W.D. Use of charcoal to separate antibody complexes from free ligand in radioimmunoassay. In: H. Van Vunakis and J.J. Langoni (Eds.), Methods in Enzymology, New York, Academic Press, 1980.

57. OMEN, G.S., ONTJES, D.A. and ANFUISEN, C.B. Fractionation of antibodies against staphylococcal nuclease on "Sephrose" immunoabsorbents. Nature, 1970, 225, 189-196.
58. PALMEIRI, G.M.A., YALLOW, R.S. and BERSON, S.A. Adsorbant techniques for the separation of antibody-bound from free peptide in radioimmunoassay. Horm. Met. Res., 1981, 3, 301-305.
59. PAZZAGLI, M., KOHEN, F., SUFI, S., MASIRONI, B. and AKAN, S.Z. Immunometric assay for lutropin (hLH) based on the use of universal reagents for enzymatic labelling and magnetic separation monitored by enhanced chemiluminescence. Journal of Immunological Methods, 1988, 114, 61-68.
60. POLSON, A., POTGLETER, G.M., LARGIER, J.F., MEARS, G.E.T. and JOUBERT, F.J. The fractionation of protein mixture by linear polymers of high molecular weight. Biochim. Biophys. Acta, 1964, 82, 463-475.
61. POURFARRANEH, M., KAMEL, R.S., LANDON, J. and DAWES, C. C. The use of magnetizable particles in solid-phase immunoassay. Methods. Biochem. Anal., 1982, 28, 267-275.
62. POURFARRANEH, M., SANDY, K., JOHSON, C. and LANDON, J. Production and use of magnetizable particles in immunoassay. Ligand, 1982, 5, 41-48.

63. POZNANSKI, N. and POZNANSKI, W.J. Laboratory application of the dextran-coated charcoal radioimmunoassay of insulin. Clin. Chem., 1969, 15, 908-918.
64. RATCLIFFE, J.G. Separation techniques in saturation analysis. Br. Med. Bull., 1974, 30, 32-37.
65. RATCLIFFE, J.G. Requiriments for separation methods in immunoassay: Trabalho apresentado no Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine (IAEA), Berlin, 1977.
66. REINCHEIZ, E.L., HUSSEY, R.E., FITZGERALD, K., SNOW, P., TORHORSTIC, C. and SHLOSSMAN, S.F. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not supressor function of human T. Lymphocytes. Nature, 1981, 294, 168-175.
67. RIBELA, M.T.C.P. and BARTOLINI, P. Stokes radius determination of Radioiodinated Polypeptide Hormones by Gel Filtration. Anal.Biochem., 1988, 174, 693-697.
68. ROBINSON, P.J., DUNHILL, P. and LILLY, M.D. The properties of magnetic supports in relation to immobilised enzyme reagents. Biotechnology and Bioengineering, 1973, 15, 603-606.
69. RODBARD, D., MUNSONI, P.J. and DE LEAN, A. Improved-curve fitting, parallelism testing, characterization of sensitivity and specificity, validation and optimization for radioligand assays. Trabalho apresentado no

Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine
(IAEA), Berlin, 1977.

70. RODBARD, D. Lessons from the computerization of radioimmunoassay: An introduction to the basic principles of modeling. In: D. Rodbard and G. Forti (Eds.), Computers in Endocrinology, New York, Review Press, 1984.
71. SANDERSON, C.J. and WILSON, D.V. Methods for coupling protein or polysaccharides to red cell by periodate oxidation. Immunochemistry, 1971, 8, 46-52.
72. SANDERSON, C.J. and WILSON, D.V. A simple method for coupling proteins to insoluble polysaccharides. Immunology, 1971, 20, 1061-1065.
73. SCIPAC protocol - Coupling of proteins to magnetic particles with the periodate method, SCIPAC, Limited, London, U.K.
74. SERONO protocol - The use of magnetic particles DAMP-R in radioimmunoassays. Serono Diagnostics, London, U.K.
75. SHINE, B., DE BEER, F.C. and PEPYS, M.B. Solid-phase radioimmunoassay for human C-reactive protein. Clin. Chim. Acta, 1981, 113, 13-23.
76. SOULDUER, J.S., STONE, D. Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double-antibody technique. Diabetes, 1965, 14, 771-779.

77. TEVAARWERK, G.J.M., BOYLE, D.A., HURST, C.J., ANGWISH, I. and UKSIK, P. Double-Antibody solid-phase separation procedures applied to various ligands. The Journal of Nuclear Medicine, 1980, 21, 540-547.
78. WIDE, L. and PORATH, J. Radioimmunoassay of proteins with use of Sephadex coupled antibodies. Biochim. Biophys. Acta, 1966, 130, 257-260.
79. WIDE, L., AXEN, R. and PORATH, J. Radioimmunosorbent assay for proteins: Chemical coupling of antibodies to insoluble dextran. Immunochemistry, 1967, 4, 381-386.
80. WIDE, L. Radioimmunoassay employing immunosorbents. Acta Endocrinol., 1969, 64, 207-221.
81. WIDE, L. Solid-phase antigen-antibody systems. In: K.E. Kirkham and W.M. Hunter (Eds.), Radioimmunoassay Methods, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971.
82. WRIGHT, J.F. and HUNTER, W.M. The sucrose layering separation: A non-centrifugation system. Trabalho apresentado no Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine (IAEA). Berlin, 1977.
83. WRIGHT, J.F. and HUNTER, W.M. A convenient replacement for cyanogen bromide activated solid-phases in immunoradiometric assays. Journal of Immunological Methods, 1982, 48, 311-325.

84. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. Immunoassay of endogenous plasma insuline in man. J. Clin. Invest., 1960, 39, 1157-1164.
85. ZETTNER, A. and DILY, P.E. Sequential saturation, a principle to increase sensitivity of competitive binding radioassays. Amer. J. Clin. Pathol., 1973, 59, 145-152.