

COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES LIVRE E LIGADA DE UM RADIOIMUNOENSAIO DE hTSH MEDIANTE PERFIS DE PRECISÃO

*E.A. ARAÚJO & **P. BARTOLINI *Deptº de Biofísica e Radiobiologia da UFPE, Recife, PE. **Divisão de Aplicações Médicas, IPEN-CNEN/SÃO PAULO-SP.

RESUMO

Foi realizado um estudo comparativo de dois meios de separação das frações livre e ligada de um radioimunoensaio de hTSH, visando a determinação do mais preciso. Os métodos utilizados foram, a fase magnética, com partículas importadas (SCIPAC, Limited, Londres) e com partículas produzidas no IPEN-CNEN/SP e fase líquida, com o 2º Anticorpo e o Polietilenoglicol. Os resultados mostraram que apesar da semelhança dos dados obtidos com as respectivas curvas padrão, a separação realizada com as partículas produzidas no IPEN, apresentou o ensaio de maior precisão, seguido pela partícula importada, pelo 2º Anticorpo e pelo Polietilenoglicol. Concluiu-se que a fase magnética poderia substituir os métodos de separação por fase líquida.

ABSTRACT

Four "Bound-Free" separation techniques were applied to a human thyrotropin hormone (hTSH) radioimmunoassay (RIA), in order to compare the resulting assay precision. The investigated separation systems were: two magnetic solid phases (2nd antibody coupled to magnetizable cellulose particle), one from a commercial source (SCIPAC, Limited, London) and the other produced in our laboratory (IPEN) and two liquid phases, second antibody and polyethyleneglicol 6000 (PEG). Computerized data showed that the investigated separation systems yielded comparable standard-curve parameters, on the other hand, the calculated precision profiles were quite different and the best results, in decreasing order, were obtained with: IPEN magnetic particles, SCIPAC magnetic particles, second antibody and PEG. It is concluded that the magnetic solid phase systems can advantageously substitute the liquid phase separation systems.

1. INTRODUÇÃO

Basicamente uma das etapas importantes nos radioimunoensaios é a separação da fração livre da ligada. Para isto, torna-se necessário uma separação física sem, no entanto, comprometer as propriedades químicas e biológicas dos componentes do ensaio.

Vários métodos de separação, já foram avaliados, considerando-se critérios de eficiência, particularidade e aplicabilidade geral. Porém, foram detectados em quase todos os métodos, erros ocasionados pela contínua presença de impurezas no ensaio final (antígenos e anticorpos que não se ligaram, iôdo livre), além de uma incompleta separação das duas fases.

A partir de 1974, teve início o uso de partículas magnéticas nos radioensaios. Essas partículas foram estudadas simultânea e independentemente por Hersh [1] e Nye [2], dando continuidade a trabalhos sobre acoplamentos de proteínas a celulose e outros suportes, utilizando o Brometo de Cianogênio [3] o Metaperiodato de Sódio [4] e o Carbonídiimidazol [5], como agentes ativadores desta fase sólida.

Este método tem como principais vantagens:

- eliminar o processo de centrifugação, pois a sedimentação da fração ligada é realizada com a aplicação de um campo magnético de baixo custo [6];
- processo de separação das frações extremamente curto, (aproximadamente 25 minutos);
- possibilidade de rápidas e repetidas lavagens do precipitado, com obtenção de ligações inespecíficas extremamente baixas.

Este trabalho, teve como principal objetivo, comparar entre si, mediante perfis de precisão, as técnicas de separação em radioimunoensaio de hTSH, por fase magnética, utilizando-se partículas importadas e partículas produzidas no nosso laboratório com métodos de separação em fase líquida, o 2º Anticorpo e o Polietilenoglicol.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

- **Tampão de ensaio:** Fosfato de Sódio 0,05 M, pH 7,4, contendo 0,1% de Soroalbumina bovina, 0,1% de Azida Sódica e 0,01% de Tween 20.
- **1º Anticorpo:** NIADDK - anti - hTSH - 3 (AFP - C6II818), fornecido pela NIADDK, Londres.
- **Hormônio empregado na radiodação:** NIADDK - hTSH - I-6 (AFP -87708), fornecido pela NIADDK, Londres.
- **Hormônio utilizado como padrão:** NIADDK - hTSH - RP-1, fornecido pela NIADDK, Londres.
- **Traçador:** Na ¹²⁵I em hidróxido de sódio 0,1 N, New England Nuclear, Boston.
- **Partículas magnéticas:** Na execução do ensaio foram utilizados a partícula M-104 da SCIPAC Limited (Londres), contendo 75% de celulose e 25% de Óxido Férrico Ferroso, já acoplada a um 2º Anticorpo (carneiro-anti-coelho) e a M-100, (SCIPAC), contendo 50% de celulose e 50% de Óxido Férrico Ferroso, na qual foi acoplado um 2º Anticorpo (carneiro-anti-coelho), produzido no IPEN [7], com diluição de 1:2,5 em Tampão Fosfato de Sódio 0,05 M, pH-7,4, contendo 10% de Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA) e 1% de soro normal de coelho, utilizando-se o Metaperiodato de Sódio como agente ativador da celulose, com uma concentração de 20% sobre o volume inicial de partículas.
- **Incubação do ensaio:** O volume inicial para o ensaio, foi de 0,3 ml, assim distribuídos:
 - **Ligação inespecífica (NSB):** 0,2 ml de soro equino normal e 0,1 ml do traçador, em duplicada.
 - **Ligação máxima (B₀):** 0,1 ml de soro equino normal, 0,1 ml do 1º Anticorpo (Anti-hTSH), com diluição de 1:200.000 e 0,1 ml do traçador em duplicata.

- **Curva padrão:** Dez pontos em decuplicata, com concentrações de hTSH variando de 0,4 a 250 U/ml, diluídos em 0,1 ml de soro equino, 0,1 ml do 1º Anticorpo (Anti-hTSH) e 0,1 ml do traçador.
- **Atividade por tubo:** 25.000 cpm.
- **Duração da incubação:** 24 horas a temperatura ambiente.
- **Sistema de contagem:** Contador gama, tipo poço com detector de NaI(Tl), modelo Cobra 5002, marca Packard, Meriden, E.U.A.
- **Etapas da separação por meio de fases magnéticas:** Após a incubação, foi adicionado a cada tubo, 0,5 ml de partículas já diluídas para a quantidade adequada ao ensaio, (importada 2 mg/ml, produzidas 3 mg/ml, após uma incubação de 25 minutos, os tubos foram introduzidos no separador magnético, o qual foi vertido, visando-se desprezar o sobrenadante, logo após foi realizada uma única lavagem com 1 ml com tampão Fosfato de Sódio 0,05 M, pH-7,4, novamente os tubos foram introduzidos no separador e após desprezar-se o sobrenadante, manteve-se os tubos sobre o papel absorvente por 5 minutos e determinou-se a atividade do precipitado.
- **Etapas da separação por meio de 2º Anticorpo:** Após incubação, foram acrescentados a cada tubo 0,1 ml do 2º Anticorpo, já diluído, iniciou-se uma 2ª incubação por 90 minutos a temperatura ambiente, logo após acrescentou-se 2 ml de H₂O destilada e os tubos foram então centrifugados por 20 minutos a 4.000 rpm/4°C, feito isto, desprezou-se o sobrenadante e determinou-se a atividade do precipitado.
- **Etapas da separação por meio de Polietilenoglicol:** Adicionou-se a cada tubo 0,05 ml de PEG a 17%, diluído em H₂O destilada, contendo 17% de Tampão Fosfato de Sódio 0,05 M, pH 7,6, centrifugou-se por 20 minutos a 4.000 rpm/4°C e após a aspiração do sobrenadante, adicionou-se

0,3 ml da solução do Cloreto de Sódio 0,4 M, logo após adicionou-se mais 0,5 ml da solução de PEG e centrifugou-se por 30 minutos a 3.000 rpm/4°C. Aspirou-se o sobrenadante e determinou-se a atividade do precipitado.

- Programa computacional: Os parâmetros dos ensaios foram obtidos pelo programa RIAKALK, que emprega o modelo matemático de ajuste log. logito de quatro parâmetros, pelo método não linear dos mínimos quadrados com reponderação iterativa, compatibilizada do sistema PC [8], utilizando um microcomputador XTII da Itautec, Brasil.
- Cálculo manual dos perfis de precisão, baseado em "n" replicatas da curva padrão: seguindo rigidamente o conceito e método de obtenção de perfis de precisão proposto por R.P. Ekins [9], foi primeiramente obtida a equação da curva, a partir da relação entre a média da resposta (% B/T) de cada 10 replicatas, plotada no eixo X, com seu respectivo desvio padrão no eixo Y.

A seguir foi construída a curva dose-resposta, com a qual foram obtidos os valores da tangente e o %B/T das quantidades 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 140, 180 e 220 µU/ml de hTSH.

A partir de %B/T de cada ponto, determinou-se com a equação da primeira curva o desvio padrão de cada ponto, que dividido pelo respectivo valor da tangente forneceu o valor do percentual de erro (% E). O valor do percentual do coeficiente de variação foi obtido pela equação:

$$\% CV = \frac{\% E}{\mu U/ml} \times 100 \quad (1)$$

E finalmente, os perfis de precisão foram traçados em gráfico semi-log.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos quatro ensaios, obtidos pelo programa com-

putacional (TABELA 1), demonstram uma significativa diferença do máximo percentual de ligação entre os dois métodos de separação (fase magnética e líquida), esta diferença é compensada por menores valores de ligação inespecífica e conseqüentemente indicam uma maior precisão da técnica de fase magnética.

Os outros parâmetros, mostram uma semelhança das curvas, indicando a reprodutibilidade nas concentrações do HTSH, independentemente do método de separação utilizado.

Os resultados obtidos com os perfis de precisão (FIGURA 1 e TABELA 2), indicam que a separação por fase magnética proporcionou uma maior precisão do ensaio, principalmente quando foi utilizada a partícula magnética produzida no IPEN, não ilegitimando, porém, os dois ensaios de separação por fase líquida.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a separação em radioimunoensaio por fases magnéticas pode ser utilizada rotineiramente, devido a:

- elevada sensibilidade e precisão do ensaio;
- reprodutibilidade dos resultados, quando comparados com metodologias convencionais de separação;
- praticidade e economia, especialmente válidas, quando as partículas são produzidas no próprio laboratório.

REFERÊNCIAS

1. HERSH, L.S. and YAVERBAUM, S. Magnetic solid-phase radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta. 1975, 69, 387-396.
2. 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.
3. AXEN, R., PORATH, J. and ERNBACK, S. Chemical coupling of

peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature, 1967, 214, 1302-1304.

4. SANDERSON, C.J. and WILSON, D.V. A simple method for coupling proteins to insoluble polysaccharides. Immunology, 1971, 20, 1061-1065.
5. 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. Apresentado no Radioimmunoassay and related procedures in medicine, (IAEA), Berlin, 1977.
6. ARAÚJO, E.A. and BARTOLINI, P. Magnetic separator of low cost for use in radioimmunoassay. Apresentado no XI Congresso de la Asociacion Latinoamericana de Sociedades de Biologia y Medicina Nuclear, Santiago de Chile, 1989.
7. BORGHI, V.C., LIN, L.H., SILVA, S.R. & BELLINI, M.H. Produção de reactivos biológicos de radioimmunoanálisis: segundo antisuero. A presentado no II Congresso Latinoamericano de Biotecnologia, Havana, 1990.
8. BORGHI, V.C., LIN, L.H., LOPES, E.M.L. e MORAES, V.K. Avaliação do RIACKALK: um programa para microcomputadores de análise de dados de radioimmunoensaio. Apresentado na 42ª Reunião da SBPC, Porto Alegre, 1990.
9. EKINS, R.P. Quality control and assay design. Apresentado no Radioimmunoassay and related procedures in medicine, (IAEA), Berlin, 1977.

TABELA 1: Dados relativos ao ensaio de htsh, com as quatro formas de separação.

| VALORES | PART. IPEN | PART. IMPORTADA | 2º Ac | PEG |
|----------------------------------|------------|-----------------|-------|-------|
| NSB (%) | 0,65 | 0,45 | 1,57 | 5,39 |
| B ₀ (%) | 31,12 | 35,21 | 53,94 | 52,52 |
| ED ₂₀ (µU/ml) | 48,43 | 44,03 | 44,85 | 35,85 |
| ED ₅₀ (µU/ml) | 12,58 | 11,16 | 10,24 | 10,57 |
| ED ₈₀ (µU/ml) | 3,27 | 2,83 | 2,34 | 3,12 |
| DOSE MÍNIMA DETECTADA (µU/ml) | 2,33 | 2,66 | 4,36 | 2,29 |

NSB = valor de ligação inespecífica; B₀ = máximo valor de ligação; ED_s: doses correspondentes ao percentual de B/B₀ (20, 50 e 80).

TABELA 2: Intervalos de determinação confiável de doses, das quatro formas de separação, aceitando-se um percentual de coeficiente de variação máximo de 10%.

| SEPARAÇÃO | DOSE MÍNIMA (µU/ml) | DOSE MÁXIMA (µU/ml) |
|-------------------|---------------------|---------------------|
| PART. IPEN | 6,4 | 115,0 |
| PART. IMPORTADA | 4,8 | 92,0 |
| 2º ANTICORPO | 7,0 | 60,0 |
| POLIETILENOGLICOL | 9,2 | 60,0 |

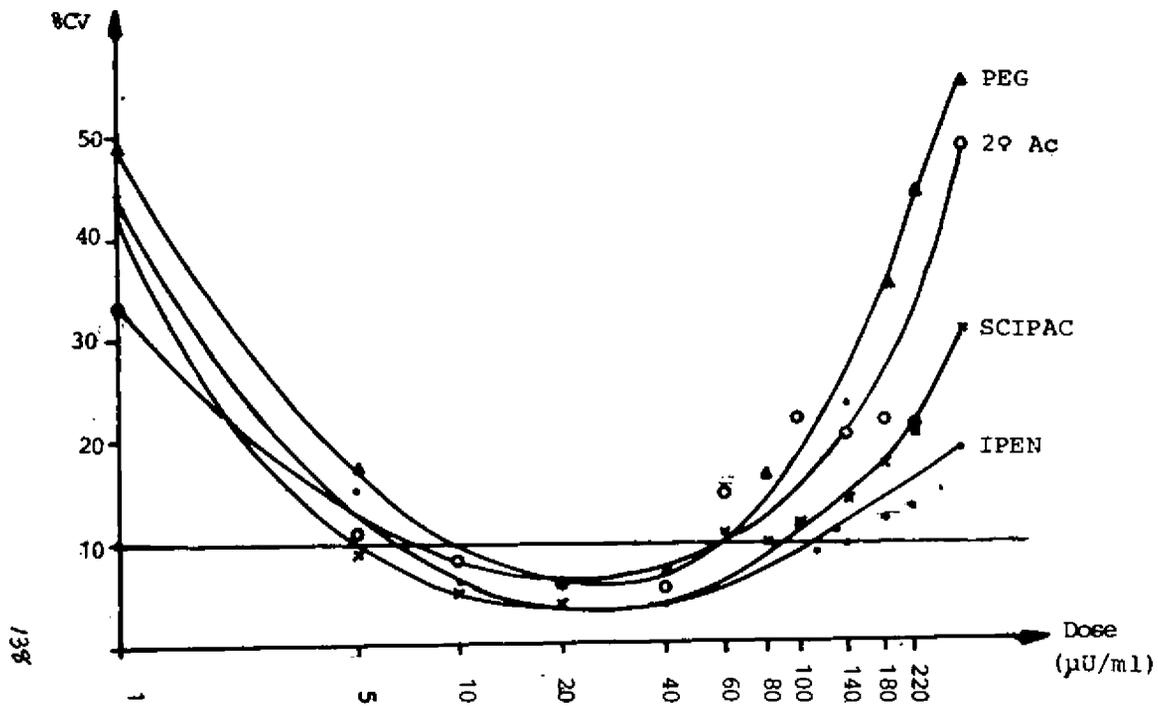


Figura 1: Perfis de precisão do ensaio do hormônio estimulante da tireóide (hTSH), obtidos com as quatro formas de separação.