

CONTROLE DE QUALIDADE DE RADIOIMUNOENSAIO PARA DOSAGEM DE  
TIREOTROFINA EM EXTRATOS HIPOFISÁRIOS HUMANOS.

LIN HUI LIN  
VÂNIA CAIRA BORGHI

COORDENADORIA DE BIOENGENHARIA, INSTITUTO DE PESQUISAS  
ENERGÉTICAS E NUCLEARES - CNEN/SP

RESUMO

Este trabalho avalia as características operacionais do radioimunoensaio (RIE), previamente desenvolvido para dosagem de tireotrofina (TSH) em extratos hipofisários humanos. A análise dos parâmetros de controle de qualidade, realizados pelas medidas de especificidade, exatidão, precisão e sensibilidade, evidenciou as características essenciais para a realização de ensaios válidos, apresentando um intervalo de determinação bastante amplo e adequado para a determinação de TSH em extratos hipofisários.

INTRODUÇÃO

O controle de qualidade do RIE, tradicionalmente realizado pelas medidas de especificidade, exatidão, precisão e sensibilidade (1,2), garante a segurança ou fidedignidade dos resultados, sendo portanto a forma de validar um método desenvolvido. No presente trabalho esses parâmetros foram rigorosamente investigados para se padronizar o RIE para dosagem de TSH, empregado no acompanhamento das etapas de purificação deste hormônio a partir de extratos crus de hipófises humanas (3,4,5).

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - RIE DE TSH:

O RIE para dosagem de TSH nos extratos hipofisários humanos foi desenvolvido conforme o método descrito por Borghi e col. (6) e apresentado sucinto a seguir:

Todos os ensaios foram realizados a 4°C pelo sistema em não-equilíbrio. Para a construção da curva dose-resposta foram incubados por 24 horas 0,1 ml da tireotrofina humana (hTSH) padrão, na concentração de zero a 400,0 uU/ml, com 0,8 ml do antissor na diluição determinada para cada traçador (diluição do antissor que apresenta 50 % de ligação específica na ausência do antígeno frio). Após esse período de pré-incubação, foi adicionado 0,1 ml do traçador e a incubação prosseguiu por mais 24 horas. A amostra que estimou a ligação inespecífica foi obtida pela incubação de 0,1 ml do traçador com 0,8 ml do tampão (Fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,4 + NaCl 0,15 M + BSA 0,1 %). As amostras controle e aquelas com teor de hTSH desconhecido foram incubadas em substituição às soluções padrão.

Finda essa incubação, as amostras foram separadas em replicatas de 0,2 ml cada, sendo determinada sua atividade em contador gama (contagens totais). Cada amostra foi ensaiada em quadruplicata, correspondendo a duplicata de incubação e duplicata de separação.

A separação da fração do antígeno ligado ao anticorpo daquele livre foi realizada pela adição de 0,5 ml da solução de polietileno glicol (PEG) a 25 % preparada em tampão veronal 0,025 M, pH 8,6, juntamente com 30 ul de soro humano normal por tubo. Os tubos foram homogeneizados em vortex, centrifugados a

1.600 força centrífuga relativa (FCR) durante 20 minutos e os sobrenadantes descartados. Os precipitados foram ressuspensos com 0,3 ml da solução de NaCl 0,4 M e reprecipitados pela adição de 0,5 ml da mesma solução de PEG, seguida de centrifugação a 1.200 FCR durante 30 minutos. Os sobrenadantes foram novamente descartados e a atividade remanescente no tubo determinado em contador gama, correspondendo a fração do traçador ligado ao anticorpo.

O cálculo da percentagem de ligação (% B) foi efetuado com as contagens totais (T) e da fração ligada (L) subtraídas da ligação inespecífica (N):

$$\% B = \frac{L - N}{T - N} \times 100 \quad (1)$$

A curva dose-resposta foi traçada em papel semi-log relacionando a % B/B<sub>0</sub> e a concentração do padrão. A concentração das amostras desconhecidas, determinada pela leitura na curva dose-resposta, foi corrigida pelo fator empregado em suas diluições.

2 - PARÂMETROS DO CONTROLE DE QUALIDADE DO RIE

ESPECIFICIDADE:

Para verificar a identidade entre o hormônio presente nos extratos hipofisários e o hormônio padrão, empregou-se uma amostra com teor de hTSH elevado, proveniente de uma das etapas iniciais de purificação do extrato hipofisário no IPEN (4). Essa amostra, diluída inicialmente 5.000 vezes foi submetida ao RIE em duplicata nas diluições realizadas de acordo com o protocolo descrito abaixo:

VOLUME DA AMOSTRA (ul)	VOLUME DO TAMPÃO (ul)	DILUIÇÃO
900	100	1: 5.555
800	200	1: 6.250
700	300	1: 7.140
600	400	1: 8.333
500	500	1:10.000
300	700	1:16.000
200	800	1:25.000

Foram calculadas a média e o desvio padrão dos 10 resultados obtidos para cada diluição, bem como as concentrações obtidas a partir do produto de cada média pelo fator de diluição correspondente.

Calculou-se também, a correlação linear entre os fatores de diluição e as concentrações médias obtidas e examinou-se a significância do coeficiente de correlação determinado.

#### EXATIDÃO:

A exatidão do RIE foi avaliada pela recuperação do hTSH padrão adicionado em quantidades crescentes de (5,0 a 200,0 uU/ml), a uma amostra de hTSH purificado no IPEN com concentração previamente determinada (17,33 uU/ml). A estimativa da concentração de hTSH nessas amostras foi realizada em decuplicata.

A recuperação das diferentes amostras foi estimada pela diferença entre o valor médio determinado a partir da curva dose-resposta e o valor teórico (obtido pela soma da concentração do hTSH presente no extrato e do hTSH padrão adicionado). Calcularam-se também a recuperação percentual média e o desvio padrão para cada amostra. Determinou-se o coeficiente de correlação entre os valores teóricos e obtidos e examinou-se sua significância.

#### PRECISÃO:

A precisão foi estimada pela reprodutibilidade intra e inter-ensaio do método, empregando-se amostras controle preparadas a partir de padrão RP-1 (National Institute of Diabetes, Digestive & Kidney Diseases, Bethesda, U.S.A.), diluído de modo a obter teores de hTSH baixo, médio e alto.

A reprodutibilidade intra-ensaio foi avaliada pela estimativa num mesmo ensaio de um número elevado de replicatas (n=25) das três amostras controle, com teores de hTSH baixo, médio e alto. Calcularam-se a concentração média e o desvio padrão para cada amostra, bem como seus respectivos coeficientes de variação.

A reprodutibilidade inter-ensaio foi avaliada pela estimativa de amostras controle semelhantes àquelas empregadas no estudo da reprodutibilidade intra-ensaio. Essas amostras foram dosadas em duplicata em 12 ensaios diferentes, realizados com quatro traçadores distintos. O valor médio para cada amostra foi calculado, bem como seu desvio padrão, permitindo a determinação dos coeficientes de variação.

#### SENSIBILIDADE:

A sensibilidade dos ensaios foi avaliada pela estimativa da dose efetiva para 50% da ligação máxima (ED50), que reflete a inclinação da curva dose-resposta e da dose mínima detectável (DMD), que correspondeu a uma queda de 10% da ligação máxima (B/Bo = 90%), dividida por cinco (1).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### ESPECIFICIDADE:

Os valores médios de hTSH de uma amostra com teor de hTSH elevado, submetida a diferentes diluições, são apresentados na Tabela I. Observa-se que esses valores, quando multiplicados pelo fator de diluição, forneceram resultados bem semelhantes. Obteve-se coeficiente de correlação linear de 0,9978, significante para  $p < 0,001$ , entre os volumes da amostra

empregados e as concentrações de hTSH determinadas (Figura 1).

A linearidade e a alta correlação demonstrada entre a diluição da amostra e a concentração hormonal determinada, comprovam a inexistência de fatores interferentes na diluição, sendo portanto uma prova da especificidade do ensaio conforme preconizado por Yalow (7). Essa especificidade permite diluir as amostras dos extratos hipofisários a serem submetidas ao RIE.

A Figura 2 exibe uma curva dose-resposta típica do RIE de hTSH, indicando que os pontos correspondentes às amostras diluídas superpuseram-se à curva construída com o hTSH padrão, sugerindo o idêntico comportamento das amostras e do padrão e validando a técnica proposta.

Tabela I. Concentração obtidas em sete diluições diferentes de uma amostra com teor de hTSH elevado.

FATOR DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE hTSH NA AMOSTRA DILUÍDA (uU/ml)	CONCENTRAÇÃO FINAL DE hTSH (U/ml)
1: 5.555	132,5 ± 10,9	0,74
1: 6.250	113,8 ± 5,3	0,71
1: 7.410	98,4 ± 2,4	0,70
1: 8.333	83,2 ± 5,8	0,69
1:10.000	70,2 ± 2,5	0,70
1:16.666	43,8 ± 2,2	0,73
1:25.000	31,2 ± 1,2	0,78
		Média = 0,72
		DP = ± 0,03
		CV = 4,02 %

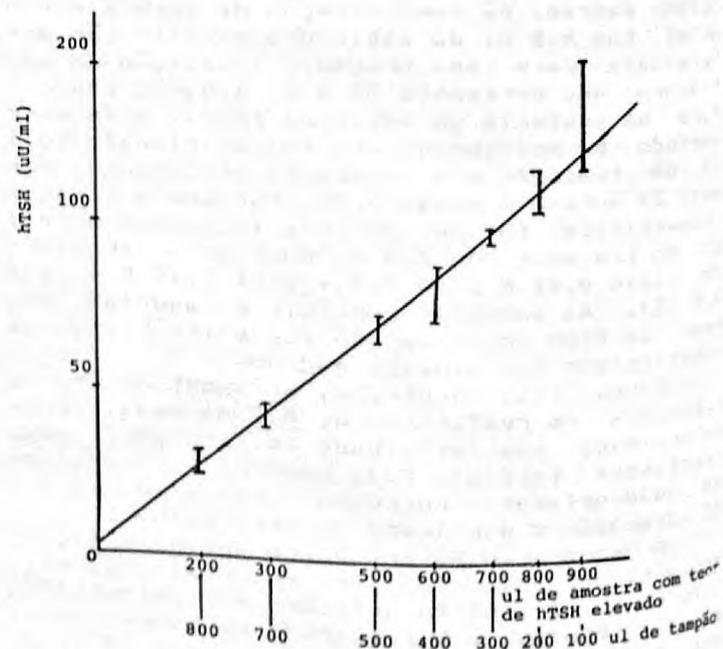


Figura 1. Efeito da diluição sobre a concentração do hTSH. A reta que melhor se ajusta é a definida pela equação  $Y = 14,1870 X + 0,8784$ , com coeficiente de correlação significante para  $p < 0,001$ .

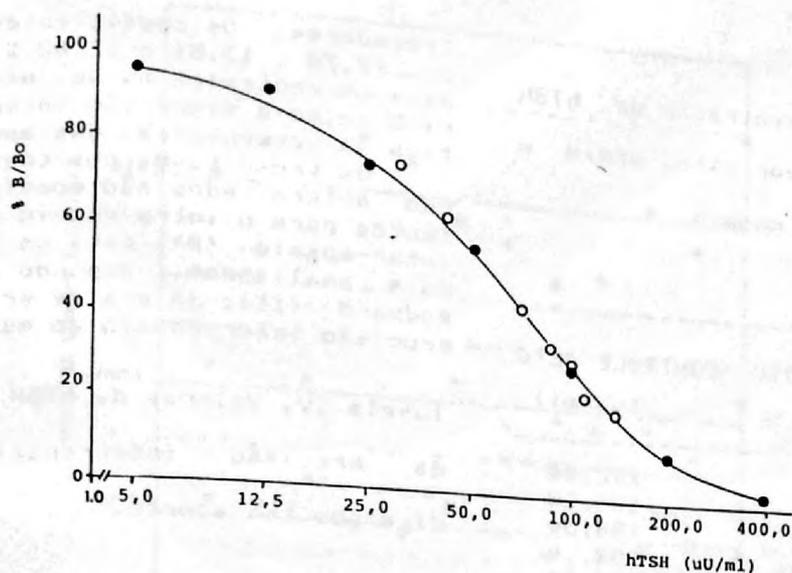


Figura 2. Efeito da diluição da amostra (○) comparado à curva dose-resposta do RIE de hTSH (●—●).

#### EXATIDÃO:

O estudo da exatidão desta técnica que exprime a relação entre o valor determinado e o valor real, revelou recuperação de solução de hormônio padrão adicionado a uma amostra com teor de hTSH conhecido variando de 80,8 a 98,0 % (Tabela II). O coeficiente de correlação linear, determinado entre as concentrações de hTSH padrão adicionadas e aquelas de hormônio recuperado foi de 0,9823, sendo significativo para  $p < 0,001$  (Figura 3). Além deste coeficiente ser considerado excelente (8), os valores da recuperação estão de acordo com os já descritos por Borghi e cols. para os RIEs de glucagon (9) e de gastrina (10).

Tabela II. Concentrações obtidas na prova de recuperação do hTSH, adicionando quantidades crescentes deste hormônio a uma amostra com teor de hTSH conhecido (17,33 uU/ml).

hTSH ADICIONADO (uU/ml)	hTSH DETERMINADO (uU/ml) Média ± DP	hTSH RECUPERADO (uU/ml)	hTSH RECUPERADO (%)
---	17,3 ± 1,8	---	---
5,0	22,6 ± 1,2	4,8	96,0
12,5	28,8 ± 1,3	11,5	92,0
25,0	37,5 ± 1,1	20,2	80,8
50,0	37,8 ± 1,3	40,5	81,0
100,0	104,8 ± 4,1	87,5	87,5
200,0	213,4 ± 10,2	196,1	98,0

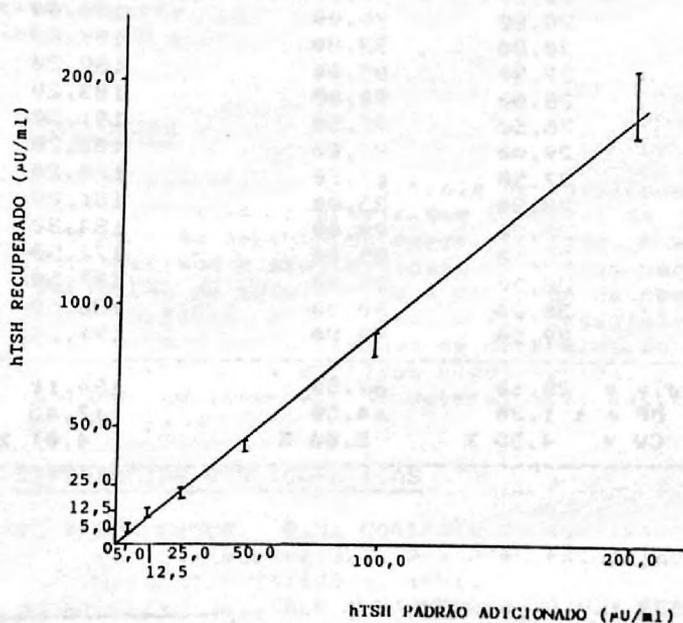


Figura 3. Estudo da recuperação do hTSH padrão adicionado a uma amostra com teor de hTSH conhecido. A reta que melhor se ajusta é a definida pela equação  $Y = 0,9823 X - 4,4021$ , com coeficiente de correlação significativa para  $p < 0,001$ .

#### PRECISÃO:

A Tabela III exibe os valores da análise da precisão intra-ensaio, em que foram dosadas num mesmo ensaio 25 replicatas das três amostras controle. Os coeficientes de variação foram de 4,55, 5,06 e 4,01 %, respectivamente, para os controles baixo, médio e alto. A Figura 4 apresenta a dispersão intra-ensaio da determinação da concentração das amostras controle.

Na Tabela IV são expressos os resultados das dosagens das amostras controle em 12 ensaios consecutivos, realizados com diferentes

Tabela III. Valores da concentração de hTSH das amostras controle com teor alto, médio e baixo, determinado num mesmo ensaio.

CONTROLE BAIXO (uU/ml)	CONTROLE MÉDIO (uU/ml)	CONTROLE ALTO (uU/ml)
28,20	92,50	192,00
30,50	87,50	185,50
28,50	82,50	188,50
27,20	90,00	183,50
29,50	82,50	187,00
28,50	85,00	193,80
29,50	95,00	193,50
27,20	90,00	181,50
28,50	88,00	186,20
30,00	90,00	181,80
28,80	85,00	170,50
28,20	86,20	189,00
28,80	90,00	180,00
30,80	93,80	189,00
29,80	85,00	189,20
28,00	90,00	183,20
25,50	97,50	181,50
29,00	95,00	182,20
27,50	87,50	160,20
28,80	85,00	181,00
28,20	90,00	184,80
25,50	85,00	172,50
28,50	85,00	187,50
30,20	90,00	186,50
29,50	98,80	191,20
Média = 28,60	89,50	184,10
DP = ± 1,30	± 4,50	± 7,40
CV = 4,55 %	5,06 %	4,01 %

traçadores. Os coeficientes de variação foram de 17,76, 12,51 e 12,02 %, respectivamente, para os controles baixo, médio e alto. A Figura 5 exibe a dispersão inter-ensaio da estimativa da concentração das amostras controle. Os resultados dos coeficientes de variação determinados são considerados como variáveis para o intra-ensaio e aceitáveis exceção inter-ensaio (8), para os três níveis hormonais analisados. Segundo as observações de Rodbard (11), já era de se esperar maior imprecisão inter-ensaio do que intra-ensaio.

Tabela IV. Valores de hTSH relativos ao estudo da precisão inter-ensaio realizados com diversos traçadores.

TRAÇADOR (n°)	AMOSTRAS CONTROLE		
	BAIXO	MÉDIO	ALTO
1	37,50	86,20	157,50
	37,50	98,75	170,00
	47,50	82,50	161,20
	32,50	95,00	176,25
2	30,00	75,00	167,50
	40,40	87,50	147,50
3	32,50	73,75	140,00
	26,25	73,75	127,50
	27,50	72,50	130,00
4	31,25	75,00	158,75
	32,50	65,00	145,00
	30,00	87,50	190,00
Média =	33,48	81,04	155,93
DP =	± 6,00	± 10,14	± 18,75
CV =	17,76 %	12,51 %	12,20 %

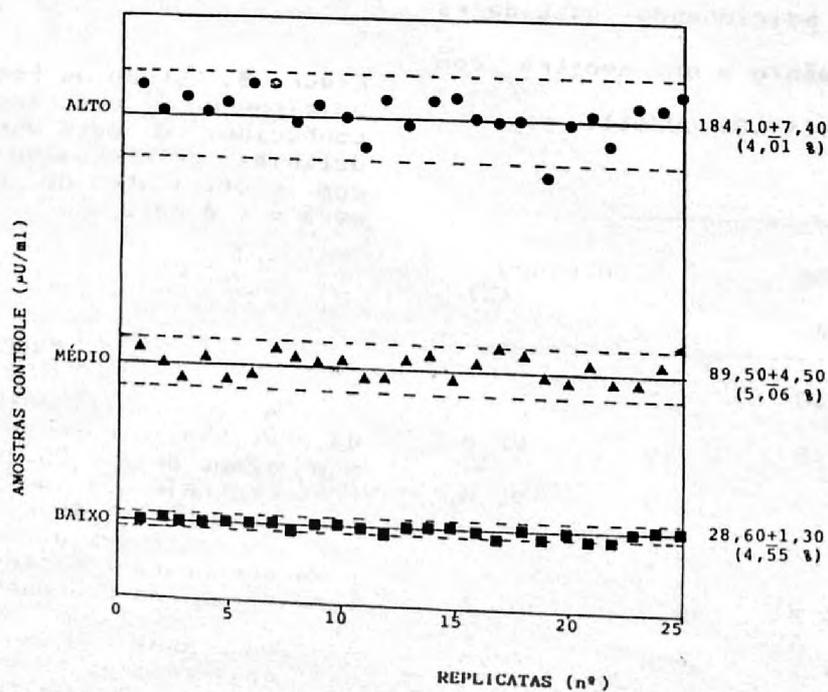


Figura 4. Variação intra-ensaio das três amostras controle dosadas com 25 replicatas. Média ± 2 DP e CV são indicados.

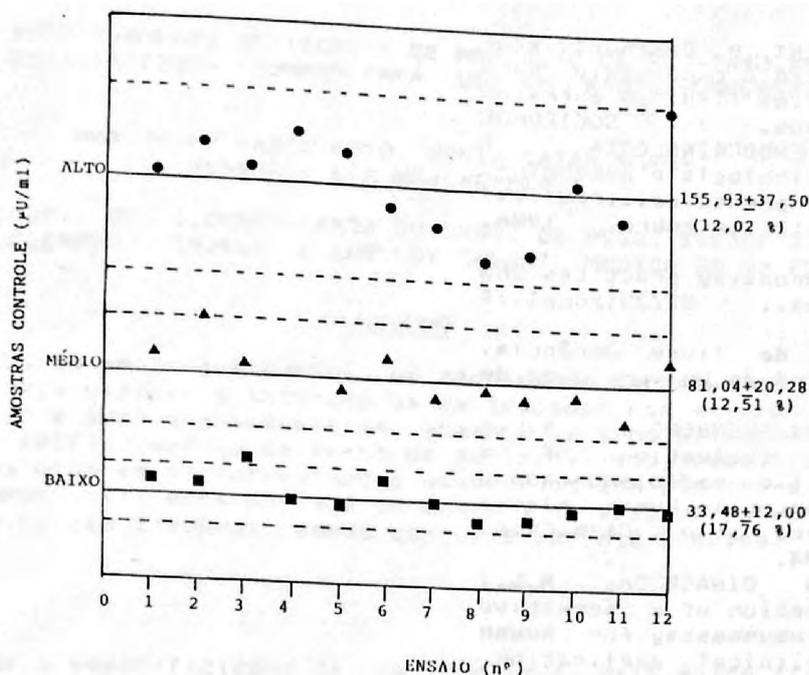


Figura 5. Variação inter-ensaio das amostras controle dosadas sistematicamente em 12 ensaios diferentes. Média  $\pm$  2 DP e CV são indicados.

#### SENSIBILIDADE:

A sensibilidade dos RIEs, que depende da afinidade entre o antígeno e o anticorpo e do erro dos pontos da curva dose-resposta (12), foi estimada com diferentes traçadores. Ela foi expressa pelos valores de ED<sub>50</sub> e de DMD, que estão apresentados na Tabela V.

Tabela V. Análise da sensibilidade dos ensaios de hTSH.

TRAÇADOR (nº)	ED <sub>50</sub> (uU/ml)	DMD (uU/ml)
1	110,00	8,00
	137,50	11,00
	92,50	7,00
	100,00	11,00
2	58,75	4,00
	65,00	6,50
3	62,50	4,25
	86,25	4,00
	65,00	3,00
4	90,00	6,00
	72,50	5,00
	102,50	5,50
5	57,50	4,00
6	52,50	3,00
	43,75	3,00
	42,50	3,00
	37,50	3,00
7	47,50	3,50
8	68,00	10,00

#### CONCLUSÕES

Os resultados do controle de qualidade do ensaio permitem concluir que o método de RIE desenvolvido apresentou especificidade, exatidão, precisão e sensibilidade adequadas para a realização de ensaios com a obtenção de resultados válidos. Além disso, o RIE desenvolvido está apto a ser utilizado na determinação dos níveis de hTSH em estratos hipofisários, apresentando um intervalo de determinação bastante amplo.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, R.H. Controle de qualidade em radioimunoensaios. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol., 25:120-4, 1981.
- MIDGLEY Jr., A.R.; DISWENDER, G.D.; REBAR, R.W. Principles for the assessment of the reliability for radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). Acta Endocrinol., 142 (suppl):163-80, 1969.
- BORGHI, V.C.; LIN, L.H.; BARTOLINI, P. Purificação de hormônio tireotrófico humano: preparação preliminar. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, setembro 1988. (Publicação IPEN 162).
- BORGHI, V.C. & LIN, L.H. Application of a human thyrotropin purified from hypophyses at IPEN-CNEN/SP in the preparation of the radioimmunoassay tracer: [<sup>125</sup>I]hTSH. In: SCIENCE and technology: VI Japan - Brazil Symposium on...realizado em São Paulo, 10-12 agosto, 1988. 60(IV):69-81 (Publicação ACIESP).
- LIN, L.H.; ARENSTEIN, I.R.; BORGHI V.C. Hormônio tireotrófico humano hipofisário: isolamento e aplicação no radioimunoensaio. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR. Energia Nuclear: Anais do 3º congresso geral de...realizado em Rio de Janeiro, 22-27 julho, 1990. caderno 12. p.57-66.

6. BORGHI, V.C. & BARTOLINI, P. Desenvolvimento da técnica de radioimunoensaio para dosagem de tireotrofina (TSH) em extratos hipofisários humanos. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Endocrinologia e metabolismo: anais do 17º congresso de...realizado em Olinda, 7-12 setembro, 1986. Recife, 1986. p.59.
7. YALOW, R.S. Radioimmunoassay practices and pitfalls. *Circ.Res.*, 32/33(suppl.): 116-25, 1973.
8. MELO, E.L. - Tese de livre docência, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1970.
9. BORGHI, V.C.; WAJCHENBERG, B.L.; ALBUQUERQUE, R.H. Evaluation of a sensitive and specific radioimmunoassay for pancreatic glucagon in human plasma and its clinical application. *Clin.Chim. Acta*, 136:39-48, 1984.
10. BORGHI, V.C.; PEIG GINABREDA, M.G.; BETARELLO, A. Evaluation of a sensitive and specific radioimmunoassay for human gastrin and its clinical application. *Eur.J.Nucl.Med.*, 16:S169, 1990.
11. RODBARD, D. Quality control for RIA: recommendations for a minimal program. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay methods and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium...realizado em Berlin, 31 outubro - 4 novembro, 1977. Viena, 1978. v.II. p.21-38.
12. SARSON, D.L. Quality control and assay mathematics. In: BLOOM S.R. & LONG R.G. eds. Radioimmunoassay of gut regulatory peptides. London, Praeger, 1982. p.42-50.

#### ABSTRACT

This work evaluates the operating characteristics of radioimmunoassay (RIA), previously developed for the determination of thyrotropin (TSH) in extracts of human hypophysis. The analysis of quality control parameters, carried out by the measurement of specificity, accuracy, precision and sensitivity, showed the main characteristics for the assessment of reliable assays, presenting a wide and appropriate range for the determination of TSH in hypophysis extracts.