

ESTUDO COMPARATIVO DO SEGUNDO ANTICORPO PARA
RADIOIMUNOENSAIO PRODUZIDO INTEGRALMENTE NO PAIS COM
SIMILAR IMPORTADO (SORO DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO)

SANDRA ROSA DA SILVA, VÂNIA CAIRA BORGHI,
BERNARDO LEO WAJCHENBERG*

COORD. DE BIOENGENHARIA DO INST. DE PESQ. ENERGÉTICAS E
NUCLEARES / CNEN-SP E LAB. DE INVEST. MEDICA 25 DA FMUSP*

RESUMO

Este trabalho compara o segundo anticorpo para radioimunoensaio (RIE) produzido no IPEN-CNEN/SP com um anticorpo comercial, de qualidade conhecida, produzido por Radioassay Systems Laboratories (RSL), EUA. Esse antissor, soro de carneiro anti-imunoglobulina (IgG) de coelho, produzido integralmente no país, apresentou título e características de precipitação semelhantes às aquelas exibidas pelo produto comercial, sendo tão adequado para a separação do RIE quanto seu similar importado.

INTRODUÇÃO

A etapa final de um RIE é a separação entre o antígeno ligado ao anticorpo daquele livre. A escolha de uma técnica adequada para a separação dessas duas frações é muito importante, pois ela é a principal fonte de imprecisão do ensaio [1].

Dentre as técnicas atualmente disponíveis, o método de separação pelo duplo anticorpo tem sido amplamente empregado. Descrito por Morgan e Lazarow [2] e por Utiger e cols. [3] em 1962, ele satisfaz a maioria dos critérios de eficiência, praticabilidade e aplicação geral [4]. Entretanto, seu custo elevado, da ordem de US\$ 2.000,00 cada 500 ml [5], é sua principal desvantagem, o que muitas vezes conduz ao emprego de reagentes menos onerosos, mas que não são tão eficientes para a separação dos RIEs.

Portanto, muitos autores têm produzido o segundo anticorpo para ser empregado em RIEs de hormônios [2, 6, 7, e 8], imunoglobulina [9], vírus [10] e ainda em ensaios onde ele está imobilizado à partícula [11 e 12].

Recentemente, foi obtido em nossa instituição um segundo anticorpo visando a produção local de reagentes biológicos de RIE para substituir os produtos importados [13].

O presente trabalho tem por objetivo realizar um estudo comparativo entre este segundo anticorpo produzido no IPEN-CNEN/SP e um segundo anticorpo comercial de referência, a fim de comprovar sua qualidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

O segundo anticorpo foi produzido em quatro carneiros imunizados com 500 µg da IgG de coelho, purificada em nossos laboratórios [14]. Essas injeções eram repetidas com intervalos de 20 dias e a cada quatro injeções de reforço eram colhidos cerca de 1,5 l de sangue pela veia jugular. Após essas sangrias, os animais eram mantidos em descanso antes de serem reinmunizados [13].

Os antissoros provenientes dessas sangrias foram avaliados quanto às suas características de precipitação em comparação com um segundo anticorpo de qualidade conhecida, produzido em cabra por RSL (lote 2R2 MBC) e distribuído por ICN Biomedicals, Inc., EUA.

Essa avaliação foi realizada pela precipitação da fração ligada do RIE de tireotrofina humana (hTSH), empregando-se um traçador preparado em nossos laboratórios, de qualidade comprovada [15] e o primeiro anticorpo proveniente do National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, EUA.

Os ensaios foram realizados em quadruplicata, incubando-se 0,1 ml do traçador (contendo aproximadamente 10.000 cpm) com 0,1 ml do tampão (fosfo-salina com EDTA 0,1 M) e 0,1 ml do primeiro anticorpo, na diluição que liga aproximadamente 50% do traçador. Foram também incubadas as amostras que estimaram a ligação inespecífica, substituindo-se o primeiro anticorpo pelo tampão. A separação das frações ligadas foi obtida pela adição de 0,1 ml do segundo anticorpo.

Analisou-se, inicialmente, o título e a quantidade de IgG carreadora empregando-se o segundo anticorpo nas diluições variando de 1:2 até 1:32, combinadas com cada uma das diluições de soro de coelho normal (SCN), que variou de 1:100 a 1:500. Foram estabelecidos os títulos do segundo anticorpo e as diluições do soro carreador que forneceram uma precipitação máxima da fração ligada do ensaio, numa região de platô.

A seguir, os antissoros provenientes de sangrias distintas que apresentaram características de precipitação similares, foram reunidos e submetidos ao estudo de sua cinética de precipitação. Nesse estudo, os antissoros foram empregados na diluição e na presença de quantidade de IgG carreadora estabelecidas, sendo incubados por um período de até seis horas em diferentes temperaturas: quatro, 20 e 37°C. O segundo anticorpo comercial foi empregado na diluição de 1:5 e na presença de 1% de SCN, seguindo-se as especificações de seu fabricante [16].

Compararam-se, também, as ligações inespecíficas fornecidas pelos anticorpos produzidos em nossa instituição com aquelas do anticorpo comercial, em ensaios realizados com traçadores diferentes, empregando-se o teste t de Student para observações não pareadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a evolução dos títulos dos anticorpos dos carneiros, no período em que foram imunizados com a IgG de coelho [13]. Como pode ser observado nessa figura, os carneiros desenvolveram anticorpos anti-IgG de coelho com títulos similares e até superiores ao recomendado pelo antissoro importado (1:5), sendo também superiores ao de um segundo anticorpo preparado anteriormente em nossos laboratórios [17].

Pela análise dessa figura observou-se comportamentos similares entre as curvas de título dos antissoros 285 e RSL, que apresentaram precipitação máxima da fração ligada do ensaio (região de platô) correspondente ao título em torno de 1:6 e à diluição do SCN de 1:100. Porém, enquanto que o antissoro RSL manteve este platô inalterado com o SCN diluído a 1:200, o antissoro 285 apresentou, nessa região, uma queda na precipitação com as diluições do SCN menores do que 1:100.

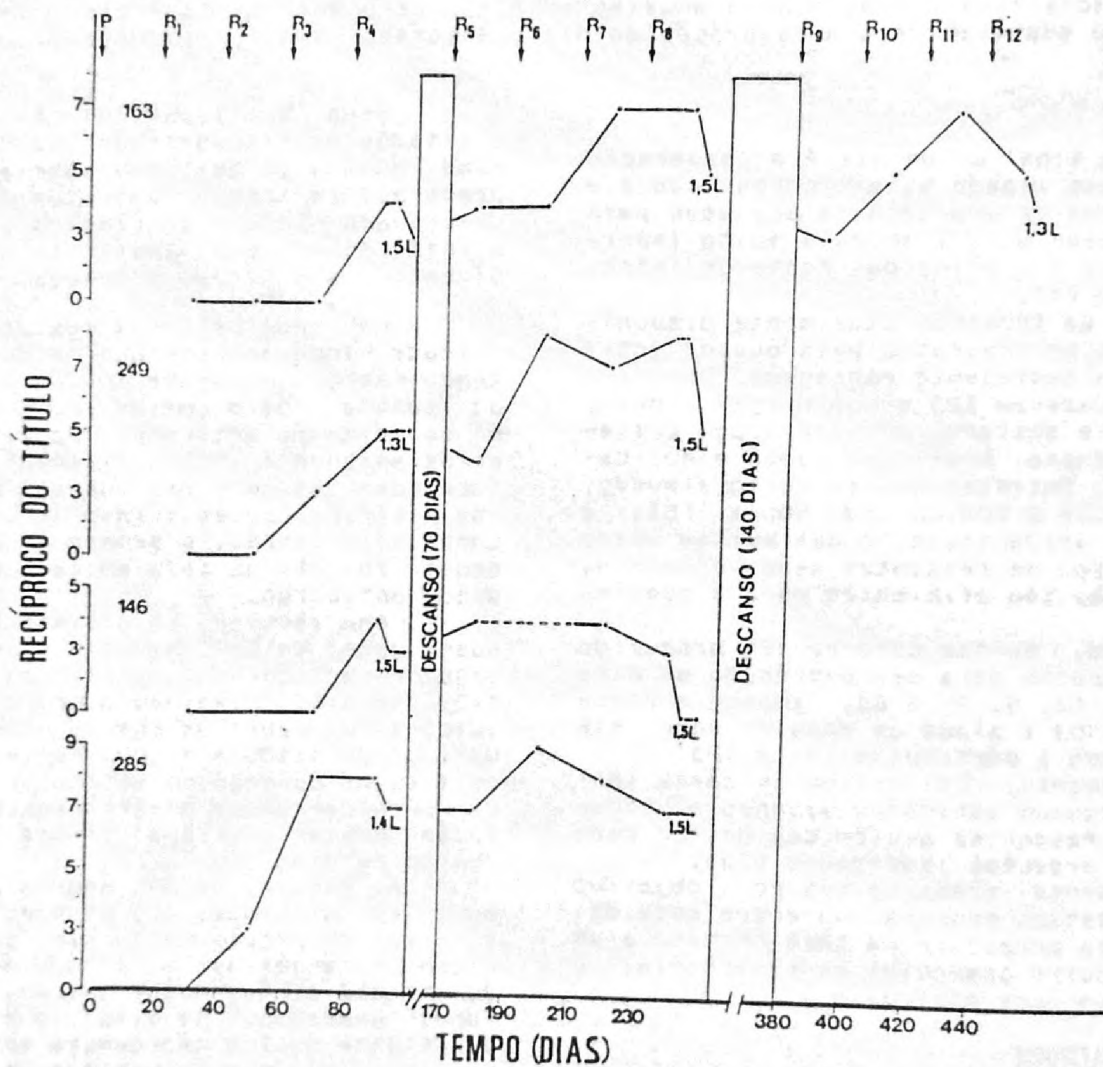
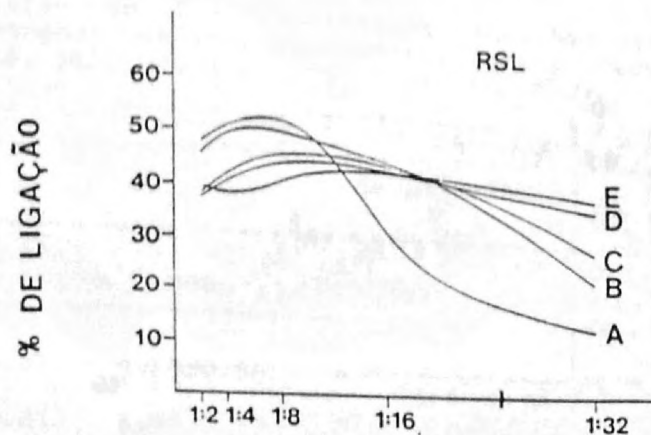


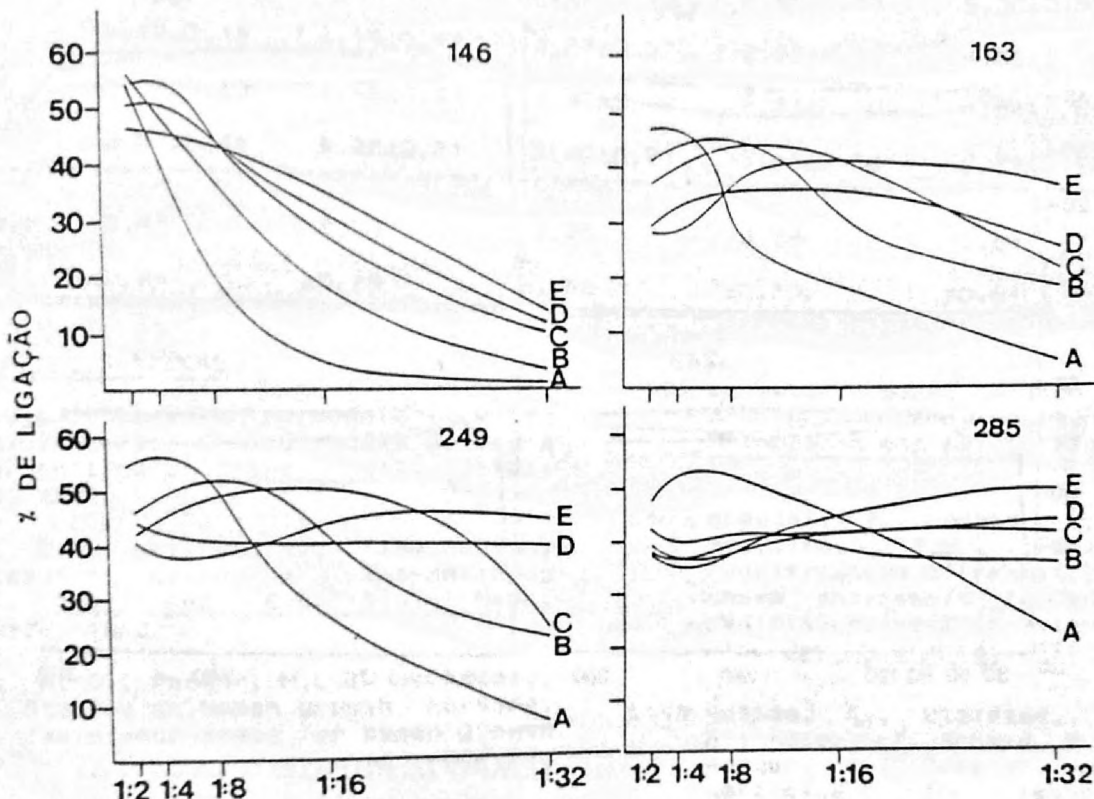
Figura 1 - Evolução do título dos segundos anticorpos para RIE preparados no IPEN-CNEN/SP. Cada antissoro é identificado pelo número do ovino indicado na figura. As setas indicam o período das injeções primária (P) e de reforço (R₁ a R₁₂). São também indicados os volumes de sangue colhidos dos animais. A linha tracejada acusa o período em que o ovino 146 esteve enfermo.

A Figura 2 exibe as curvas de título dos segundos anticorpos construídas na presença de diferentes concentrações de soro carreador não imune. Essas curvas se referem aos antissoros obtidos na última sangria de cada animal, as quais se mostraram bastante semelhantes àsquelas obtidas nas sangrias anteriores (dados não apresentados).

Os antissoros 163 e 249 apresentaram a precipitação máxima com títulos menores e com o SCN diluído a 1:100. Ao contrário dos demais, o antissoro 146 apresentou seu platô de precipitação máxima com quantidade menor de SCN (diluição 1:300). Esse efeito da utilização de concentrações menores de soro carreador não imune, também foi verificado por Chapman e cols. [7] em antissoros anti-IgG de coelho produzido em burros.



RECÍPROCO DO TÍTULO DO 2º ANTICORPO



RECÍPROCO DO TÍTULO DO SEGUNDO ANTICORPO

Figura 2 - Curvas de título dos antissoros preparados no IPEN-CNEN/SP (146, 163, 249 e 285) e comercial (RSL) contruídas na presença de várias diluições do soro de coelho normal: 1:100 (A), 1:200 (B), 1:300 (C), 1:400 (D) e 1:500 (E).

A Figura 3 apresenta os resultados do estudo da cinética de precipitação dos antissoros, realizado em diferentes temperaturas. Observa-se que todos os antissoros apresentaram uma taxa de precipitação praticamente inalterada com o aumento da temperatura de quatro para 20°C, enquanto que essa taxa diminuiu quando a temperatura aumentou para 37°C. Os antissoros 146 e 285 exibiram a precipitação máxima após 1,0 h de incubação a quatro ou 20°C, enquanto que o antissoro 163 revelou a precipitação máxima mais rapidamente (após 0,5 h) nessas temperaturas e aquele 249 mais tardiamente (após 1,5 h) nas três temperaturas analisadas.

Resultados similares foram encontrados com o antissoro RSL, que conforme recomendado pelo seu fabricante [16], apresentou a precipitação máxima quando incubado por aproximadamente 1,0 h (45 minutos) à temperatura ambiente.

Relatos da literatura se referem a produção de antissoros de burro anti-IgG de carneiro e de cabra, que apresentaram taxa de precipitação acelerada com o aumento da temperatura de quatro para 37°C, mas que atinge a precipitação máxima somente após no mínimo 2,5 h de incubação [7].

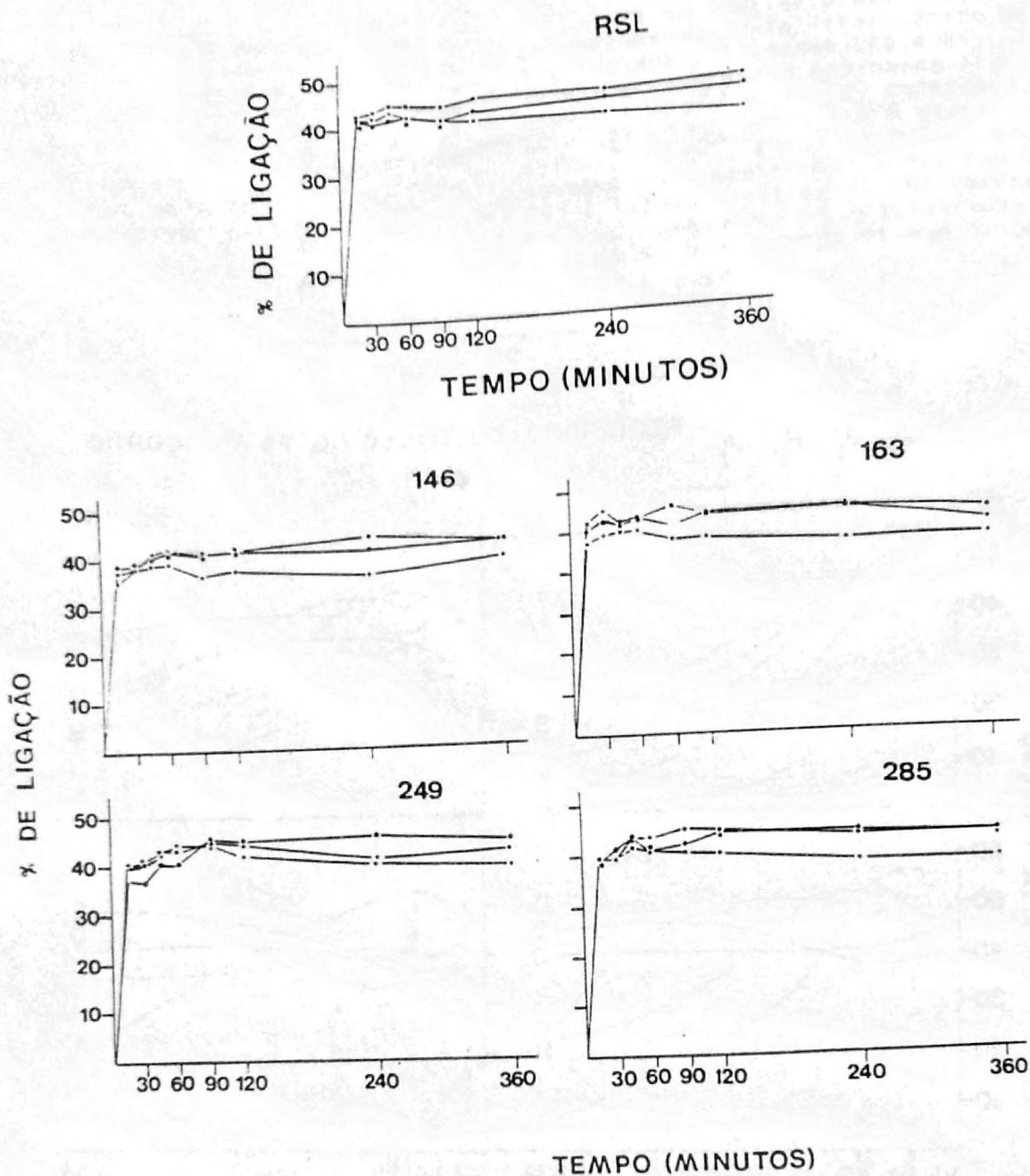


Figura 3 - Efeito da temperatura: *—* 42°C, ○—○ 20°C e ●—● 37°C na precipitação do RIE realizada com os segundos anticorpos: 146 (título de 1:4 e SCN a 1:300), 163 (título de 1:3 e SCN a 1:100), 249 (título de 1:4 e SCN a 1:100), 285 (título de 1:6 e SCN a 1:100) e RSL (título de 1:5 e SCN a 1:100).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o duplo anticorpo produzido integralmente no país, em nossa instituição, apresentou características de precipitação similares as dos anticorpo importado, demonstrando ser tão adequado quanto o anticorpo comercial para ser empregado na separação do RIE.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura de São Paulo a doação dos ovinos (Processo S.A. nº 48.181./88) e ao National Hormone and Pituitary Program (EUA) os reagentes biológicos para o RIE de hTSH.

Na tabela I são expostos os resultados das ligações inespecíficas fornecidas pelos segundos anticorpos, cujos valores médios não diferiram significativamente quando se compararam os antissoros IPEN com aquele comercial.

Tabela I - Valores das ligações inespecíficas obtidas em vários RIEs de hTSH separados pelos segundos anticorpos produzidos no IPEN-CNEN/SP (146, 163, 249 e 285) e comercial (RSL).

ANTISSOROS					
	RSL	146	163	249	285
	3,73±0,33	1,75±0,08	4,27±0,54	3,66±0,60	2,70±0,34
	5,28±0,21	3,44±0,43	2,23±0,07	4,96±0,47	3,13±0,23
	3,39±0,44	4,22±0,43	3,27±0,35	3,39±0,30	3,46±0,58
	2,95±0,09	4,12±0,15	3,55±0,49	2,98±0,36	3,20±0,13
	3,12±0,15	4,14±0,17	3,27±0,37	2,92±0,18	4,03±0,98
	2,82±0,25	3,49±0,11	2,83±0,12	2,71±0,10	4,04±0,65
	2,57±0,14	3,38±0,21	3,40±0,21	3,11±0,38	2,71±0,47
Média	3,41	3,50	3,26	3,39	3,32
DP	±0,84	±0,79	±0,58	±0,70	±0,51

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Borghi, U.C., "Dosagens hormonais in vitro com radioisótopos. Considerações gerais e análise crítica", Cienc. Cult., 35(10): 1456-66, 1982.

[2] Morgan, C.R., Lazarow, A., "Immunoassay of insulin using a two-antibody system", Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 110: 29-32, 1962.

[3] Utiger, R. D., Parker, M.L., Daughaday, W.H., "Studies on human growth hormone. I. A radioimmunoassay for human growth hormone", J. Clin. Invest., 41: 254-61, 1962.

[4] Ratcliffe, J.G., "Separation techniques in saturation analysis", Br. Med. Bull., 30:32-7, 1974.

[5] ICN Biomedicals Inc. Diagnostics Division. International Product List. Carson, 1988. p. 5. Precipitating antisera.

[6] Hales, C.N., Randle, P.J., "Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate", Biochem. J., 88: 137-46, 1963.

[7] Chapman, R.S., Munro, A.C., Templeton, J.G., Fatori, D., "Production of second antibody for radioimmunoassay". In: Hunter, W.M., Corrie, J.E.T., eds., Immunoassay for clinical chemistry. London, Churchill Livingstone, p. 456-68, 1983.

[8] Calzado, M.C.A., Suárez, R.G., Alvarez, R., "Producción de anticuerpo anticurriel en conejos para su uso como anticuerpo precipitante en el radioinmunoensayo", Rev. Cubana. Invest. Biomed., 6(1): 89-94, 1987.

[9] Dunnette, S.L., Gleich, G.J., "Double-antibody radioimmunoassay for IgE", Methods in enzymology 77: 634-45, 1981.

[10] Higuchi, T., Ogata, H., Veiga, S.S., Nogueira, Z.M., Felipe, J.M.M.S., "Purification of rabbit IgG, obtention of sheep antirabbit IgG and their use in radioimmunoassay of avian leukosis virus-p15", Rev. Microbiol., 19(1): 82-8, 1988.

[11] Nustad, K., Utelstad, J., Berge, A., Ellingseu, T., Schmid, R., Johansen, L., Borner, O., "Use of monosized polymer particles in immunoassay", In: Radioimmunoassay and related procedures in medicine, Proceedings of a Symposium, held in Viena 21-25 June, pag. 45-55, 1982.

[12] Kakabakos, S.E., Evangelatos, G.P., Ithakissios, D.S., "Immunoabsorption of IgG onto second antibody covalently attached to amino-dylark beads for radioimmunoassays", Clin. Chem., 36/3, 497-500, 1990.

[13] Borghi, U.C., Silva, S.R., Bellini, M.H., Lin, H.L., "Produção de reagentes biológicos para radioimunoensaio: segundo anticorpo", São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1992, (Publicação IPEN 361).

[14] Silva, S.R., Borghi, U.C., "Isolamento e purificação da imunoglobulina (IgG) de coelho para a produção de segundo anticorpo para radioimunoensaio", São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1990, (Publicação IPEN 294).

- [15] Borghi, U.C., Lin, L.H., e DiDio, R., "Quality control of radioiodinated human thyrotrophin for radioimmunoassay". In: 12º Congresso Panamericano de Endocrinologia, Recife, 2 - 8 novembro, p.173, 1990.
- [16] Second antibody, Radioassay Systems Laboratories, Inc. Catalog. Carson, catalog nº 1930 (specification sheet).
- [17] Borghi, U.C., Contribuição ao conhecimento das alterações do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide na hipoproteïnemia experimental em ratos Wistar Albinos (Rattus norvegicus albinus). São Paulo, 1978. (Tese de doutoramento, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).

SUMMARY

This work compares a second antibody for radioimmunoassay (RIA) produced at IPEN-CNEN/SP with a commercial one of known quality, produced by Radioassay Systems Laboratories, USA. This antiserum, sheep serum anti-rabbit IgG produced in its totality in the country, presented title and precipitation characteristics similar to those exhibited by the commercial product, being as suitable for the RIA separation as its imported similar.