



CNEN/SP

BR 9533663
INLS-62--357

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**ENSAIO IMUNORADIOMÉTRICO ULTRA-SENSÍVEL DE
TIREOTROFINA HUMANA (hTSH) OBTIDO MEDIANTE
A IDENTIFICAÇÃO E MINIMIZAÇÃO DE
LIGAÇÕES INESPECÍFICAS**

CIBELE NUNES PERONI

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear.

Orientador: Dr. Paolo Bartolini

São Paulo

1994

17 VOL 26 Nº 23

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES CNEN/SP

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**ENSAIO IMUNORADIOMÉTRICO ULTRA-SENSÍVEL DE TIREOTROFINA
HUMANA (hTSH) OBTIDO MEDIANTE A IDENTIFICAÇÃO E MINIMIZAÇÃO DE
LIGAÇÕES INESPECÍFICAS**

Cibele Nunes Peroni

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear**

Orientador: Dr. Paolo Bartolini

São Paulo

1984



AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paolo Bartolini pela orientação;

Aos colegas da Supervisão de Radioensaios pela participação e apoio na realização deste trabalho, especialmente à Maria Teresa pelo ensino e incentivo e à Irene pelos conselhos e pelas correções;

Ao Dr. José Roberto Rogero pelo apoio;

Ao CNPq pela concessão de bolsa de mestrado;

À IAEA e à FAPESP pela concessão de recursos financeiros;

Ao IPEN-CNEN/SP pela utilização das dependências e recursos dos laboratórios;

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	7
OBJETIVOS.....	15
MATERIAIS.....	17
1. PREPARAÇÕES DE HORMÔNIO HUMANO ESTIMULADOR DA TIREÓIDE (HTSH) E DE ANTICORPOS ANTI-HTSH.....	17
2. MATERIAL RADIOATIVO.....	17
3. MATERIAL PARA PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL RADIOCIDADO (125I-MAB).....	17
4. MATERIAL PARA A REAÇÃO DE ACOPLAMENTO DO ANTICORPO À FASE SÓLIDA.....	18
5. OUTROS REAGENTES.....	18
6. TUBOS.....	18
7. AGITADORES ROTATÓRIOS DE TUBOS ("ROTATORS").....	18
8. SEPARADOR MAGNÉTICO.....	19
9. CONTADOR.....	19
MÉTODOS.....	20
1. PREPARAÇÕES DE REFERÊNCIA E AMOSTRAS CONTROLE DE QUALIDADE.....	20
2. MARCAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-HTSH.....	20
2.1. Repurificação do traçador.....	21
2.2. "Limpeza" do traçador.....	21
2.3. Filtração e centrifugação do traçador.....	22
3. PREPARAÇÃO DA FASE SÓLIDA MAGNÉTICA.....	22
3.1. Lavagem da fase sólida.....	25
4. PROTOCOLO DO ENSAIO.....	25
5. CÁLCULO DE SENSIBILIDADE.....	26

5.1. Sensibilidade analítica.....	26
5.2. Sensibilidade funcional.....	27
RESULTADOS.....	28
1. IDENTIFICAÇÃO DA LIGAÇÃO INESPECÍFICA.....	28
1.1. Estudo do esquema e do tempo de ensaio.....	28
1.2. Estudo de estocagem e da purificação do traçador.....	31
2. MINIMIZAÇÃO DA LIGAÇÃO INESPECÍFICA.....	42
2.1. Repurificação do traçador.....	42
2.2. "Limpeza" do traçador.....	44
2.3. Adição de soro.....	47
2.4. Combinação de diferentes métodos utilizados para diminuir a ligação inespecífica.....	47
2.5. Filtração e centrifugação do traçador.....	47
2.6. Saturação da fase sólida durante o acoplamento e sua posterior lavagem.....	51
3. OBTENÇÃO DE CURVAS DE HTSH ULTRA-SENSÍVEIS UTILIZANDO UM SISTEMA OTIMIZADO.....	53
DISCUSSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

ENSAIO IMUNORADIOMÉTRICO ULTRA-SENSÍVEL DE TIREOTROFINA HUMANA (HTSH) OBTIDO MEDIANTE A IDENTIFICAÇÃO E MINIMIZAÇÃO DE LIGAÇÕES INESPECÍFICAS

Cibele Nunes Peroni

RESUMO

Um IRMA de hTSH, baseado em separação por fase sólida magnética, foi estudado especialmente com relação às ligações inespecíficas. Estas foram identificadas como sendo um produto da interação entre uma forma alterada do anticorpo monoclonal anti-hTSH radioiodado (^{125}I -mAB) e a partícula de celulose magnética não acoplada (matriz). Aparentemente esta forma de ^{125}I -mAB é um tipo de agregado que pode ser parcialmente separado do do pico principal pela cromatografia em Sephadex G-200 e além disso minimizado através de uma pré-incubação simples com a mesma matriz. Saturação da fase sólida com proteínas do leite, estocagem do traçador a 4°C e adição de soro durante a incubação foram também consideradas particularmente efetivas na prevenção da sua formação.

Estas condições foram utilizadas para que houvesse uma diminuição reprodutível das ligações inespecíficas para valores $<0,1\%$ (ou $<70\text{cpm}$), aumentando assim a razão sinal-ruído (B_{99}/B_0) para valores de 300-500. Desta maneira obtivemos radioensaios de hTSH com sensibilidades funcionais de aproximadamente 0,05mUI/L e sensibilidades analíticas da ordem de 0,02mUI/L, que os classificam pelo menos entre os melhores ensaios de 2ª geração e excelentes para IRMAs magnéticos. Um cálculo mais otimista da sensibilidade, baseado na definição de Rodbard, forneceu valores de até 0,008mUI/L. Ressaltamos também que tais sensibilidades foram obtidas de uma maneira altamente reprodutível e durante toda a vida útil do traçador.

Ultrasensitive human thyrotropin (hTSH) immunoradiometric assay (IRMA) set up, through identification and minimization of non specific bindings

Cibele Nunes Peroni

ABSTRACT

An IRMA of hTSH, based on magnetic solid phase separation, was studied especially for what concerns its non specific bindings. These were identified as a product of the interaction between an altered form of radiolodinated anti-hTSH monoclonal antibody (^{125}I -mAB) and the uncoupled magnetizable cellulose particle (matrix). Apparently this form of ^{125}I -mAB is a type of aggregate that can be partly resolved from the main peak on Sephadex G-200 and further minimized via a single pre-incubation with the same matrix. Solid phase saturation with milk proteins, tracer storage at 4°C and serum addition during incubation were also found particularly effective in preventing its formation.

These findings were used in order to reproducibly decrease non specific bindings to values <0.1% (or <70cpm), increasing thus the signal-to-noise ratio (B_{00}/B_0) up to values of 300-500. This way we obtained hTSH radioassays with functional sensitivities of about 0.05mIU/L and analytical sensitivities of the order of 0.02mIU/L, which classify them at least as among the best 2nd generation assays and that are excellent indeed for magnetic IRMAs. A more optimistic sensitivity calculation, based on Rodbard's definition, provided values down to 0.006mIU/L. Such sensitivities, moreover, were obtained in a very reproducible way and all over the useful tracer life.

INTRODUÇÃO

O hormônio humano estimulador da tireóide (hTSH) ou tireotrofina é uma glicoproteína formada por duas subunidades (alfa e beta) não covalentemente ligadas. A subunidade alfa é comum aos outros dois hormônios glicoproteicos (folículo-estimulante e luteinizante) da hipófise anterior; seu peso molecular é de 20-22kd correspondente a 32 aminoácidos no ser humano. A subunidade beta é única para cada um desses hormônios e confere a especificidade biológica: possui aproximadamente 112 aminoácidos, com peso molecular de 18kd (77, 81).

Este hormônio possui ação reguladora sobre o eixo hipotálamo-pituitário-tireóide, estimulando a produção e a secreção dos hormônios tireoideanos (triiodotironina e tiroxina).

A secreção do hTSH é controlada pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH), um tripeptídeo hipotalâmico e pelos hormônios tireoideanos, através de um mecanismo de retro-regulação. Quando há diminuição dos níveis dos hormônios tireoideanos na circulação, ocorre um aumento da concentração sérica de TSH, como acontece no hipotireoidismo primário. Por outro lado, uma elevação nos níveis de triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4) acarreta a supressão da secreção de TSH, resultando em concentrações inferiores às dos indivíduos normais (de 0,6 a 4,6 mUI/L de hTSH) nos casos de hipertireoidismo (44, 77).

Em condições normais, as concentrações de hTSH circulantes são similares em ambos os sexos, sendo os valores mais altos encontrados nas primeiras semanas de vida. A secreção desse hormônio obedece a um ritmo circadiano, com níveis maiores durante a noite, o que não influencia a utilidade clínica da sua determinação, desde que observado o horário da retirada de amostras sanguíneas, permitindo assim o estabelecimento de intervalos de referência para indivíduos normais (eutiroides), hipertireoideos ou

hipotireoideos (29, 38, 82).

Por estas razões, a determinação do hTSH no soro ou plasma tem sido considerada, desde a introdução de vários ensaios imunométricos comerciais na metade da década de 80, um teste tireoideano bastante simples, sensível e específico (14, 50, 80). Os ensaios imunométricos são notoriamente mais sensíveis que os radioimunoensaios convencionais, a sensibilidade reportada pela literatura podendo ser definida como analítica ou funcional. Geralmente são considerados capazes de distinguir os indivíduos normais da grande maioria dos casos de hipertireoidismo, cujos níveis de TSH geralmente são inferiores a 0,01mU/L (33, 38, 42, 65, 68, 80), visto que não é discutível o seu valor diagnóstico para o hipotireoidismo primário. Conseqüentemente, sua utilização como um teste inicial na avaliação da função tireoideana em pacientes ou na triagem de recém-nascidos para o hipotireoidismo congênito (neonatal) tem adquirido grande importância (3, 8, 21, 36, 61).

A sensibilidade analítica (limite de detecção) para um ensaio de hTSH é definida pela American Thyroid Association (ATA) como sendo a concentração correspondente à média mais ou menos 2,5 vezes o desvio-padrão (DP) da resposta equivalente a multireplicatas da dose zero, quando realizada num intra-ensaio (29). O número de multireplicatas (n) não é categoricamente definido, mas a maioria dos autores utiliza geralmente entre 8 e 20 replicatas (33, 43, 46, 47, 56, 70). O fator que multiplica o desvio-padrão também varia de 2 a 3DP (25, 31, 43, 48, 59). Por outro lado, a sensibilidade funcional é definida, por alguns autores, como a menor dose na qual o coeficiente de variação (CV) inter-ensaio é 10% ou menor (69, 82), enquanto outros utilizam um CV entre 10 e 20% (8, 29, 48, 57, 70), o que dificulta a inter-comparação dos valores reportados.

Uma classificação interessante e bastante utilizada para os vários tipos de imunoensaios de hTSH é aquela baseada em três gerações ou etapas de

desenvolvimento e que foi introduzida por Spencer e col. (70), na qual cada nova geração de ensaio apresenta uma melhora de aproximadamente 10 vezes no desempenho funcional sobre a geração prévia. Foi ainda recentemente reportada, pelo mesmo grupo de pesquisa (71), uma quarta geração de ensaios, que envolve a adição de uma etapa de saturação da fase sólida ao ensaio quimioluminescente (ICMA) de terceira geração, anteriormente avaliado pelos mesmos autores (70). Assim, de acordo com esta classificação, teríamos os seguintes limites máximos de sensibilidade funcional para cada geração de ensaio: 1-2mUI/L (primeira geração); 0,1-0,2mUI/L (segunda geração); 0,01-0,02mUI/L (terceira geração); 0,001-0,002mUI/L (quarta geração). Lembramos porém que, no caso destas gerações serem definidas através da sensibilidade analítica, teremos valores de sensibilidade aproximadamente 5 vezes maiores. Um exemplo é o ICMA de terceira geração, descrito por Spencer (70), que mostrou possuir a capacidade de atingir valores de sensibilidade para o hTSH das seguintes ordens: sensibilidade analítica de 0,003mUI/L e sensibilidade funcional de 0,018 mUI/L. A sensibilidade analítica foi determinada utilizando 8 replicatas intra-ensaio da dose zero e a funcional com um CV inter-ensaio de 20%.

Com o desenvolvimento destes ensaios capazes de determinar concentrações mais baixas de TSH e normalmente classificados como de terceira geração, surgiram os termos "ultra-sensível" e "super-sensível", que são algumas vezes erroneamente utilizados para estes sistemas (50). Numa tentativa de diminuir a confusão gerada sobre a denominação dos sistemas, a American Thyroid Association (29,80) recomenda que, para um ensaio de hTSH ser declarado como verdadeiramente sensível e com potencial para uso clínico como teste diagnóstico primário da função tireoideana, o mesmo deveria estar de acordo com certas normas analíticas e de desempenho relativas aos principais parâmetros que caracterizam um imunensaio e que são expostas a seguir:

- sensibilidade analítica e funcional: já definidas acima, com a recomendação de

utilizar o limite de detecção funcional, visto que o mesmo considera as condições de ensaio mais típicas da prática clínica laboratorial;

- precisão: o CV inter-ensaio deve ser de 10 a 15% e preferencialmente <20% para concentrações de TSH ao redor de 0,1mU/L;

- exatidão: os resultados médios dos ensaios realizados utilizando padrões OMS (Organização Mundial da Saúde) ou MRC (Medical Research Center), devem estar no intervalo de $\pm 5\%$ do valor declarado;

- linearidade de resposta: os resultados relativos às amostras, diluídas no mesmo tampão (a composição deste deve ser declarada pelo fornecedor) utilizado para a diluição da preparação padrão, devem ser paralelos à curva dose-resposta dentro de $\pm 10\%$;

- recuperação: as quantidades de padrão adicionadas a amostras de pacientes devem ser recuperadas em $\pm 10\%$ ao longo de todo o intervalo de trabalho do ensaio;

- ligação cruzada: com os hormônios folículo-estimulante, luteinizante e gonadotrófico, deve ser <0,1%;

- efeitos de matriz: soros de pacientes com suspeita de hipertireoidismo devem estar dentro de $\pm 5\%$ do sinal fornecido pela dose zero da preparação de referência.

No caso dos radioimunoensaios (RIA) clássicos, onde o esquema de ensaio baseia-se na competição entre o antígeno "frio" (no caso hormônio não marcado) e o mesmo antígeno marcado com ^{125}I (traçador) por uma quantidade limitada de sítios de ligação do anticorpo, tem-se para o hTSH um limite de detecção analítico da ordem de 0,5 a 1,0mU/L (10, 14, 25, 57). Desse modo, o RIA é classificado como sendo de primeira geração e tem seu uso restrito para a avaliação de concentrações de hTSH relativamente altas, visto que sua sensibilidade não permite o diagnóstico do hipertireoidismo. Com estes

esquemas competitivos de ensaio, o diagnóstico tornou-se difícil uma vez que uma fração substancial dos indivíduos normais possuem concentrações séricas de hTSH abaixo do limite de detecção do RIA. Mesmo para os RIA otimizados com a finalidade de aumentar a sensibilidade, os resultados obtidos em geral não são clinicamente satisfatórios ou demandam ensaios muito demorados (2, 6, 64, 66). Este problema acarretava a necessidade constante da utilização do teste de estímulo pelo TRH, associado à determinação dos hormônios tireoideanos (T_3 e T_4), para a obtenção de um diagnóstico definitivo (45).

Com o advento dos anticorpos monoclonais a partir de 1975 (37), foi possível uma melhora da especificidade e sensibilidade do ensaio imunoradiométrico (IRMA), um sistema que já havia sido anteriormente descrito por Miles e col. (49). O aumento do intervalo de trabalho, da especificidade e da sensibilidade está principalmente relacionado com o próprio esquema de ensaio, no qual podem ser utilizados dois ou até mesmo três anticorpos monoclonais, ao invés do único anticorpo policlonal utilizado nos radioimunoensaios (9, 50, 59). Numa das configurações mais utilizadas para o IRMA, denominada dois-sítios tipo "sanduíche", um anticorpo, geralmente monoclonal, é radioiodado (anticorpo de detecção) e utilizado em excesso no ensaio, o que favorece cineticamente a reação de ligação entre este anticorpo e o hTSH que funciona como antígeno. A separação entre a fração ligada e a livre em geral é realizada utilizando um outro anticorpo (monoclonal ou policlonal), que encontra-se ligado a uma fase sólida e que tem afinidade por um sítio antigénico diferente da mesma molécula de hTSH (20, 29).

Estes ensaios imunoradiométricos clássicos de segunda geração possuem sensibilidade analítica entre 0,01 e 0,10mUI/L, ou seja, um limite de detecção aproximadamente 10 vezes maior do que o do RIA (70, 80).

Mais recentemente, com a tecnologia alternativa da marcação com compostos não isotópicos, apareceu a terceira geração de ensaios, que apresenta sensibilidade analítica entre 0,001 e 0,01mUI/L (48, 70, 80). Nesta

classe de ensaios, a marcação do anticorpo geralmente é realizada com fluoróforos (ensaios imunofluorimétricos-IFMA), enzimas (ensaios imunoenzimométricos-IEMA) ou com moléculas quimioluminescentes (ensaios imunoquimioluminescentes-ICMA).

Enquanto que os esquemas competitivos (radioimunoensaios) são facilmente classificados como de primeira geração, não há sempre, de acordo com os dados da literatura, uma clara distinção entre ensaios de segunda e terceira gerações.

Um exemplo deste fato é o ensaio imunoradiométrico (IRMA) comercializado pela Behring (Marburg, Alemanha) denominado RIA-gnost, que utiliza um anticorpo monoclonal marcado com ^{125}I e o outro anticorpo acoplado ao próprio tubo de ensaio. Este sistema radioisotópico normalmente seria incluído na segunda geração, mas foi várias vezes relatado com valores de sensibilidade analítica enormemente variáveis de 0,003 a 0,080mUI/L (25, 42, 48, 56, 63, 76), o cálculo tendo sido sempre realizado utilizando 10 a 20 replicatas da dose zero + 2DP.

No caso do Sucrosep, um sistema comercial da Boots-Celltech (Slough, Reino Unido), foram encontrados valores de sensibilidade analítica que variaram de 0,01 a 0,12mUI/L (6, 25, 31, 33, 38, 45, 46, 48, 67). Este IRMA envolve a utilização de dois anticorpos monoclonais, um marcado com ^{125}I e o outro covalentemente ligado a uma fase sólida (Sephacryl S300, Pharmacia). Neste ensaio, a separação entre ^{125}I -mAB ligado e não ligado é realizada mediante a adição de uma solução de sacarose, sendo que a fração ligada precipita e a fração livre é aspirada (33, 46).

O mesmo comportamento indefinido, quanto classificação em gerações, pode ser observado em ensaios não isotópicos como o DELFIA ("Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay"), que se baseia na detecção fluorimétrica do lantanídeo európio e que é considerada a primeira

metodologia não radioisotópica ultra-sensível desenvolvida com a utilização de anticorpos monoclonais (23, 72). Este sistema envolve um excesso de anticorpo monoclonal (mAB) marcado com európio e um mAB imobilizado nas paredes de micro-placas, onde a incubação é processada (52, 53). Sua comercialização é realizada pela Pharmacia (Uppsala, Suécia), sendo um sistema largamente utilizado e cuja sensibilidade analítica declarada varia também enormemente entre 0,003 e 0,050 mUI/L (35, 38, 41, 43, 48, 52, 53, 72, 76).

Uma das vantagens destes traçadores não isotópicos é a possibilidade de obterem-se atividades específicas muito mais altas que as obtidas com radioisótopos, uma vez que estas são cerca de 10^6 vezes maiores para compostos marcados com európio em relação aos marcados com ^{125}I (73). Além disso, outras características específicas do európio, como a diferença entre o comprimento de onda de absorção e de emissão da fluorescência (aproximadamente 300nm) e o longo tempo de decaimento de emissão, com conseqüente diminuição da fluorescência inespecífica (30), contribuem para que sistemas como o DELFIA apresentem um desempenho melhor e sejam classificados na terceira geração (22, 35). Contudo, os mesmos muitas vezes apresentam uma avaliação analítica e clínica equivalente a um ensaio de segunda geração (42, 63), sendo que ao mesmo tempo para alguns ensaios do tipo IRMA, como já observamos para o RIA-gnost, têm sido reportadas sensibilidades da mesma ordem ou até maiores.

É nossa opinião que esta enorme variação de desempenho inter-laboratorial possa ser devida, juntamente a outros fatores, às variações na razão sinal-ruído e a um controle não otimizado das ligações inespecíficas.

Publicações recentes reportam estratégias empregadas com a finalidade de aumentar ainda mais o limite de detecção para substâncias de interesse clínico, como é o hTSH, através da utilização de traçadores com propriedades amplificadas (por exemplo enzimas), associados a uma técnica de detecção luminescente ultra-sensível (39, 40). Houve com isto um aumento da

utilização de ensaios quimioluminescentes, cujo limite de detecção analítico para o hTSH varia geralmente de 0,001 a 0,005mUI/L (48, 51, 63, 74, 75, 80). Porém, mesmo para os sistemas mais sensíveis desenvolvidos até o momento, existem ainda algumas restrições, sendo uma delas o efeito deletério sobre a constante de afinidade do anticorpo e sobre a cinética de reação antígeno-anticorpo, quando o anticorpo é conjugado a macromoléculas, como é o caso das enzimas (55). Outra questão levantada, a qual foi principalmente discutida por Ekins (23), é a vantagem prática de utilizarem-se ensaios com limites de detecção ainda maiores do que os já disponíveis, para construção de sistemas de imunoensaio em "microspot" que poderão permitir, teoricamente, a determinação simultânea de milhares de substâncias diferentes em amostra de aproximadamente 1ml. Utilizando um destes sistemas, Ekins declara ter alcançado para o hTSH uma sensibilidade da ordem de 0,0002mUI/L.

Ao nosso ver, mesmo não contestando o brilhante futuro que possam vir a ter estas aplicações desenvolvidas recentemente, muito pode ainda ser realizado para melhorar o desempenho dos imunoensaios clássicos em geral e dos radioensaios em particular, para que possam ser melhor utilizados em nossa realidade. É dentro desta visão, que se coloca o objetivo do nosso trabalho, o qual não direciona seus esforços à introdução de novos esquemas de ensaio ou de novos traçadores, mas ao aprimoramento de um sistema já disponível e de seu potencial de sensibilidade, através do máximo incremento de sua razão sinal-ruído.

OBJETIVOS

O presente trabalho foi iniciado a partir da consideração de que um dos fatores principais que influenciam a sensibilidade dos imunoenaios, em conjunto com o esquema do ensaio (reação em excesso de antígeno ou de anticorpo, adição simultânea ou não dos reagentes, tempo de incubação, temperatura), concentração e afinidade do anticorpo, atividade específica do traçador, é a ligação inespecífica (20, 22, 27, 35, 43, 54).

Particularmente de interesse para as nossas atividades e para o tipo de determinações a serem realizadas na triagem do hipotireoidismo congênito, são os sistemas radioisotópicos com separação magnética especialmente práticos para laboratórios que não possuem centrífugas, notoriamente existentes em regiões menos desenvolvidas. Um exemplo é o Maia Clone da Serono (Woking, Surrey, Reino Unido), para o qual foram relatadas sensibilidades analíticas que variam de 0,04 a 0,25mUI/L (17, 18, 25, 26, 44, 48, 58, 82). No Maia Clone são utilizados três anticorpos monoclonais, onde uma mistura de dois desses anticorpos é marcada com ^{125}I e o terceiro é conjugado a uma partícula de celulose magnetizada (44, 58). Outro radioensaio magnético da Ciba-Coming (Medfield, MA, EUA), que utiliza um anticorpo monoclonal marcado com ^{125}I e um policlonal para captura, apresentou sensibilidades analíticas de 0,02 a 0,06mUI/L (56, 76). Portanto, de acordo com estes dados, os dois sistemas magnéticos descritos acima são propriamente incluídos na segunda geração, não chegando ao desempenho do anteriormente mencionado Ria-gnost, por razões que nós acreditamos estarem especialmente relacionadas com o teor da ligação inespecífica. Este último parâmetro, presente freqüentemente em porcentagem relativamente alta, que varia de 0,4% a aproximadamente 1% (47, 58, 61), ao nosso ver é provavelmente originado por um traçador alterado, que se liga inespecificamente à fase sólida na ausência de hTSH. De fato, os sistemas de

separação magnética, cuja utilidade e praticidade são bastante conhecidas e aceitas (1, 27), apresentam geralmente uma baixa sensibilidade analítica, de 0,20 a 1,00mUI/L (17-19, 25, 44, 47, 61), com exceção de alguns dos valores já mencionados para os sistemas da Serono e da Corning nem sempre confirmados pela maioria dos autores.

O objetivo principal do presente trabalho é portanto a identificação da origem e da natureza química destes efeitos inespecíficos ou de matriz, visando sua eliminação ou minimização para obter uma melhora da qualidade do sistema, principalmente quanto à sensibilidade do mesmo. Assim, poderá ser ressaltado o verdadeiro potencial dos ensaios radioisotópicos em geral e do IRMA magnético em particular que, como já observado, freqüentemente apresentam um desempenho limitado por fatores que independem do próprio traçador.

Para esta finalidade utilizaram-se reagentes preparados em nosso laboratório e já testados exaustivamente quanto a sua qualidade e desempenho: um padrão secundário de hTSH, um anticorpo monoclonal marcado com ^{125}I e um sistema de fase sólida magnética acoplada a um anticorpo policlonal de alta avidéz. Importante foi a escolha dos dois anticorpos (poli e monoclonal), que devem apresentar afinidade por sítios antigênicos diferentes na molécula de hTSH e cuja compatibilidade determina o nível de ligação específica (24, 59).

Enfim, com estes reagentes e com a utilização de métodos que diminuam e controlem a ligação inespecífica, pretendeu-se obter sistemas IRMA de qualidade equivalente aos comerciais importados, tentando ao mesmo tempo situar o desempenho do nosso sistema magnético otimizado na classificação em gerações acima mencionada. Juntamente com estas metas, procurou-se também obter outro resultado de relativamente difícil alcance: uma reprodutibilidade das baixas porcentagens de ligações inespecíficas, com conseqüente reprodutibilidade da alta sensibilidade obtida ao longo de toda a vida útil do traçador.

MATERIAIS

1. Preparações de hormônio humano estimulador da tireóide (hTSH) e de anticorpos anti-hTSH

- Padrão Internacional de hTSH para Imunoensaio (IRP-1) gentilmente fornecido pelo National Pituitary Program (NPP/NIDDK, Rockville, MD, EUA).
- Anticorpo monoclonal (mAB) anti-hTSH utilizado para radiodação (anticorpo de detecção) adquirido da firma Serono (Woking, Surrey, Reino Unido); códigos das preparações utilizadas: TSH.0182 0002 e TSH.0584 0001.
- Anticorpo policlonal (pAB) anti-hTSH para preparação da fase sólida magnética (anticorpo de captura), gentilmente cedido pelo Dr. Alexander Bulatov da Academia Russa de Ciências (Moscow, Rússia).

2. Material radioativo

- Na¹²⁵I comercial, livre de carregador e oxidantes, fornecido pela Nordion Europe S.A. (Fleurus, Bélgica) em concentração de aproximadamente 18,5MBq/ μ l (500 μ Ci/ μ l).

3. Material para purificação do anticorpo monoclonal radioiodado (¹²⁵I-mAB)

- Sephadex G-150 (40-120 μ m), G-200 (10-40 μ m) e G-25 (20-80 μ m) adquiridos da Pharmacia-LKB (São Paulo, Brasil)

4. Material para a reação de acoplamento do anticorpo à fase sólida

- **Partícula magnética: celulose magnetizada (partículas de Fe_3O_4 adsorvidas à celulose) fornecida comercialmente pela SCIPAC (Sittingbourne, Kent, Reino Unido), de código M174, cuja proporção entre celulose e Fe_3O_4 é de 75:25, com tamanho das partículas de 20–40 μ m.**
- **Acetona, PA, Merck (São Paulo)**
- **1-1'-carbonildiimidazol (CDI) e soro-albumina bovina (BSA) da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EUA)**
- **Leite desnatado em pó Molicco, Nestlé (São Paulo), composição declarada: gordura (1%), proteínas (36%), lactose (52%), sais minerais (8%), água (3%)**

5. Outros reagentes

- **Azida sódica , cloramina-T (PA), gelatina e triton-X, adquiridos da Merck (São Paulo)**
- **γ -globulina bovina e tween 20, Sigma (St Louis, MO, EUA)**
- **Metabissulfito de sódio (RP), Carlo Erba (São Paulo)**

6. Tubos

- **Tubos de poliestireno (7,5 x 1,0cm) da Emtel (São Paulo)**

7. Agitadores rotatórios de tubos ("Rotators")

- **Os agitadores foram fornecidos pelo laboratório NETRIA (North East Thames Region Immunoassay Unit, Londres, Inglaterra).**
-

8. Separador magnético

- **AMERLEX-M (N-4001) da Amersham (Aylesbury, Buckinghamshire, Reino Unido)**

9. Contador

- **Contador gama tipo "poço" modelo Cobra auto-gamma, com troca automática de amostra, da Packard Instrument Company (Illinois, EUA), cuja eficiência aproximada para o ^{125}I é de 80%.**

MÉTODOS

1. PREPARAÇÕES DE REFERÊNCIA E AMOSTRAS CONTROLE DE QUALIDADE

O padrão secundário de hTSH utilizado neste estudo já havia sido preparado e padronizado por Ribela e col., em um estudo inter-laboratorial sobre sua calibração (60). Porém, nos principais testes realizados, utilizou-se um outro padrão secundário também de origem hipofisária obtido do NPP/NIDDK. Esta última preparação na forma liofilizada foi reconstituída como indicado e diluída nas seguintes concentrações utilizadas no ensaio: 60; 30; 15; 7,5; 3,0; 0,6 e 0,3mUI/L de hTSH, sendo que a dose zero corresponde ao tampão de ensaio. As concentrações mencionadas foram confirmadas através de uma recalibração com o padrão secundário obtido do laboratório NETRIA, com o qual o nosso laboratório colabora dentro de um programa da IAEA (Agência Internacional de Energia Atômica).

Os controles de qualidade das curvas dose-resposta foram 3 pools de soros com os seguintes valores de hTSH, determinados em nosso laboratório: baixo (CQ-B = $1,36 \pm 0,45$; n=22), médio (CQ-M = $3,37 \pm 0,85$; n=22) e alto (CQ-A = $21,22 \pm 3,79$; n=22).

2. MARCAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-hTSH

O anticorpo monoclonal anti-hTSH foi marcado utilizando 50 μ g da preparação em tampão fosfato 0,05M; pH 7,4, pelo método clássico de oxidação química com cloramina-T (28). Foram utilizados 37MBq (1mCi) de 125 I e 10 μ g de cloramina-T no mesmo tampão fosfato, num volume total de reação de 30 μ l

completados com tampão fosfato 0,5M, sendo que a reação é interrompida após 30 segundos com a adição de 10µg de metabissulfito de sódio em 10µl de fosfato 0,05M. As condições foram ajustadas para obtenção de um reagente com atividade específica ao redor de 15µCi/µg (61).

O produto obtido foi purificado em colunas cromatográficas de filtração em gel Sephadex G-150 (0,9 x 60cm, fluxo = 3ml/h) ou Sephadex G-200 (1,5 x 80cm, fluxo = 2ml/h), sendo que a eluição foi realizada com tampão NaH₂PO₄ 0,05M pH7,4 com BSA 1% e azida sódica 0,1%. A estocagem foi realizada em diferentes condições: produto liofilizado, mantido a -20°C ou a 4°C.

A qualidade deste traçador já havia sido testada em um estudo inter-laboratorial (61) em comparação com mesmo o ¹²⁵I-mAB (anticorpo monoclonal radioiodado) marcado pelo laboratório NETRIA.

2.1. Repurificação do traçador

A repurificação do traçador foi realizada na mesma coluna Sephadex G-200 ou em colunas Sephadex G-25 tipo seringa (1,5 x 5,0cm), sendo que esta última somente elimina o ¹²⁵I liberado durante a estocagem.

2.2. "Limpeza" do traçador

Outro tratamento realizado com o anticorpo marcado foi a incubação desse reagente, antes do ensaio, com partículas magnéticas não acopladas, para retirar as moléculas que de alguma forma produzem as ligações inespecíficas. Esta operação foi definida como um tipo de "limpeza" do ¹²⁵I-mAB.

Após a padronização deste método, foram sempre utilizadas as seguintes condições: 50µl de traçador (correspondentes a 5-10 x 10⁶cpm), adicionado a 2,5mg (50µl) de partícula magnética em 400µl de tampão Na₂PO₄ 0,05M pH7,4; azida sódica 0,1%, sob agitação por um período de 4h a

temperatura ambiente. A seguir, o traçador foi separado por sedimentação magnética e utilizado no ensaio.

2.3. Filtração e centrifugação do traçador

O ^{125}I -mAB foi filtrado através de filtro Millipore $0,22\mu\text{m}$, utilizando bomba de vácuo da Millipore (São Paulo).

A centrifugação foi realizada numa centrífuga Eppendorf (Hamburg, Alemanha) modelo 5415C por 30min a 12000rpm (11750g).

3. PREPARAÇÃO DA FASE SÓLIDA MAGNÉTICA

O agente ativador da partícula magnética (celulose magnetizada M174) é o 1-1'-carbonildiimidazol (CDI), sendo que este reagente liga-se covalentemente à celulose no procedimento de ativação realizado em acetona e posteriormente a grupos peptídicos da molécula do anticorpo policlonal anti-hTSH (16).

O procedimento de acoplamento foi realizado segundo protocolo da SCIPAC e do NETRIA (19), introduzindo-se algumas modificações. Por esta metodologia ser de importância fundamental para o nosso trabalho, descrevemos a seguir detalhadamente as três etapas fundamentais deste procedimento:

a) Etapa de ativação da partícula magnética

- agitar o frasco de partículas magnéticas até completa dispersão das mesmas, sendo que esta agitação pode ser realizada num sistema tipo "roller" a 30rpm por 30 minutos a temperatura ambiente;
- pipetar imediatamente o volume desejado ($20\text{ml}=1\text{g}$);

- centrifugar por 10min a 1000g e descartar o sobrenadante;
- completar com água para o volume inicial e agitar por 5 minutos;
- centrifugar e repetir esta lavagem com água;
- completar com acetona para o volume inicial e agitar;
- centrifugar e repetir três vezes esta lavagem com acetona;
- completar com acetona para o volume inicial e agitar;
- adicionar CDI de maneira que a concentração final seja de 0,24mol/L, uma modificação realizada por nós e que corresponde aproximadamente ao dobro da quantidade ótima determinada (0,15mol/L) por Chapman e col. (16), sendo também diferente das quantidades utilizadas nos protocolos da SCIPAC e do NETRIA (19);
- agitar por 1 hora a temperatura ambiente;
- centrifugar e descartar o sobrenadante;
- completar com acetona para o volume inicial e agitar por 5 minutos;
- repetir três vezes esta lavagem com acetona e filtrar em sistema de filtração a vácuo da Millipore (São Paulo) através de filtro de lã de vidro;
- deixar o sedimento de partícula ativada secando "overnight" a temperatura ambiente.

b) Etapa de acoplamento

- pesar a quantidade desejada de partícula magnética;
- adicionar quantidades adequadas do anticorpo e de tampão borato de sódio 0,05M, pH8,0. que correspondem a 0,6ml do anticorpo policlonal (pAB) utilizado neste estudo e a 14,4ml do tampão borato para 1g de partícula ativada;
- agitar por 72 horas a temperatura ambiente;

c) Etapa de lavagem

- centrifugar por 15 minutos a 1000g, reservando o sobrenadante para posterior leitura espectrofotométrica do mesmo;

- adicionar 20ml de etanolamina 0,5M, pH9,5 ao precipitado, no caso de ter sido utilizado 1g de partícula, e agitar por 20 minutos;
- centrifugar e descartar o sobrenadante para cada lavagem realizada;
- adicionar 20ml de tampão bicarbonato de sódio 0,5M, pH8,0 e agitar por 20 minutos;
- adicionar 20ml do tampão bicarbonato com 1% de BSA e agitar;
- adicionar 20ml do mesmo tampão com 1% de leite desnatado e agitar, sendo que estas lavagens com adição de BSA e de leite foram por nós introduzidas;
- repetir a primeira lavagem com tampão bicarbonato;
- adicionar 20ml de tampão acetato de sódio 0,1M, pH4,0 e agitar;
- repetir duas vezes esta última lavagem com agitação de 1 hora cada;
- adicionar 20ml de tampão fosfato de sódio 0,05M, pH7,4; 0,1% de azida sódica e agitar por 20 minutos;
- repetir esta última etapa;
- adicionar o mesmo tampão fosfato de sódio com 0,5% de BSA.

A seguir, o rendimento do acoplamento foi determinado ponderalmente através da liofilização de alíquotas provenientes da fase inicial e final do processo, considerando também a diferença da leitura espectrofotométrica ($A=280\text{nm}$) do sobrenadante (anticorpo) antes e após o acoplamento. Subseqüentemente, a fase sólida obtida foi estocada numa concentração de 25mg/ml a 4°C.

A quantidade ideal de fase sólida/tubo utilizada no ensaio foi definida através da determinação das porcentagens de ligação correspondentes à dose zero de hTSH (ligação inespecífica ou mínima, B_0) e à dose de 60 mUI/L (ligação específica ou máxima, B_{60}), o que permite o cálculo da razão sinal/ruído (B_{60}/B_0) um parâmetro de qualidade também utilizado por outros autores (47).

A qualidade deste reagente foi comparada com aquela da fase magnética produzida pelo NETRIA, que é baseada na mesma matriz M174.

3.1. Lavagem da fase sólida

Um tratamento dispensado à fase sólida já acoplada, especialmente depois de longos períodos de estocagem, é a sua lavagem com tampão NaH_2PO_4 0,05M pH7,4; NaCl 0,5M; triton-X 0,5%; azida sódica 0,1%, antes de ser utilizada no ensaio. A fase sólida é lavada duas vezes a temperatura ambiente, sendo a sedimentação realizada em imã ou no próprio separador magnético por 15 minutos. Isto permite a remoção de moléculas do pAB desacopladas que diminuiriam as ligações específicas (83).

4. PROTOCOLO DO ENSAIO

As incubações foram realizadas baseando-se no protocolo do NETRIA (adição simultânea de todos os reagentes) num volume total de 500 μl , com algumas alterações. Quando não especificado, o protocolo foi o seguinte:

- tampão (NaH_2PO_4 0,05M pH7,4; BSA 1%; tween 20 0,5%; azida sódica 0,1%): 145 μl ;
- padrão e/ou controles: 200 μl ;
- soro eqüino, comprovadamente sem TSH imunorreativo com o anticorpo utilizado (hTSH = 0 mUI/L): 25 μl (5%);
- ^{125}I -mAB: 50 μl com aproximadamente 60000cpm totais;
- fase sólida magnética: 2,0mg/tubo, correspondentes a 80 μl para os acoplamentos utilizados.

Após permanecer por um período de aproximadamente 16 horas ("overnight") sob agitação a temperatura ambiente, a separação da fração ligada foi realizada por sedimentação no separador magnético. Esta fração ("pellet") foi

lavada duas vezes com o mesmo tampão utilizado na lavagem da fase sólida, contando-se a radioatividade do sedimento num contador de radiação gama, calibrado para detectar eventos simples e em coincidência (5). O tempo de contagem foi de 1 ou 5 minutos de acordo com o tipo de experimento e a radioatividade da amostra, no sentido de minimizar os erros principalmente para doses baixas de TSH (26, 46).

5. CÁLCULO DE SENSIBILIDADE

Para estabelecer válidas comparações com os dados da literatura, a sensibilidade do sistema foi calculada utilizando-se três métodos: dois analíticos e um funcional.

5.1. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica pode ser calculada pela medida de hTSH correspondente a multireplicatas ($n=20$) da dose zero de hTSH, somando-se 2,0; 2,5 ou 3,0DP, como largamente relatado na literatura (29, 48, 74, 76, 80).

Outra maneira freqüentemente utilizada para calcular este parâmetro (35, 58) é a formulação de Rodbard (62), que se baseia em um teste-t não pareado ($p=0,05$) realizado comparando-se as respostas relativas à dose zero (ligação inespecífica, B_0) e as respostas relativas à dose experimental mais baixa, significativamente diferente da dose zero (no caso, 0,3mUI/L). Segundo Rodbard, a dose mínima detectável (DMD) é dada por:

$$DMD = \frac{Y_{\min} - Y_0}{\operatorname{tg}\alpha}$$

sendo que:

$$Y_{\min} = Y_0 + t \cdot s_p \sqrt{\frac{1}{N_0} + \frac{1}{N_1}}$$

$$s_p = \sqrt{\frac{s_0^2 \cdot (N_0 - 1) + s_1^2 \cdot (N_1 - 1)}{N_0 + N_1 - 2}}$$

Y_{\min} = resposta mínima detectável;

Y_0 = resposta da dose zero;

$\operatorname{tg}\alpha$ = tangente da curva em correspondência à dose zero;

t = "t" de Student para nível de significância 95% e $(N_0 + N_1 - 2)$ graus de liberdade;

N_0 = número de medidas da dose zero;

s_0 = desvio-padrão das medidas da dose zero;

N_1 = número de medidas da dose experimental mais baixa;

s_1 = desvio-padrão das medidas da dose experimental mais baixa;

5.2. Sensibilidade funcional

A sensibilidade funcional foi derivada do perfil de imprecisão obtido com o programa para radioimunoensaio (PC/RIA) denominado IAEA-TECDOC-509, sendo por nós adotada como : dose correspondente a um CV (coeficiente de variação) inter-ensaio igual a 20% (48, 70, 80).

RESULTADOS

1. IDENTIFICAÇÃO DA LIGAÇÃO INESPECÍFICA

1.1. Estudo do esquema e do tampão de ensaio

Os primeiros experimentos realizados objetivaram o estudo do tempo de incubação a ser utilizado em nossas avaliações, incluindo também a influência de algum componente do tampão sobre o desempenho do ensaio, especialmente em relação à razão sinal-ruído.

Foi realizada uma comparação entre o esquema de ensaio convencionalmente utilizado por nós (incubação simultânea de todos os reagentes durante aproximadamente 16h) e o esquema de incubação do hTSH + ¹²⁵I-mAB por 3h com a adição retardada da fase sólida magnética. Este último reagente foi adicionado por períodos de 0,5 a 3h, sendo que os resultados encontram-se na tabela I.

TABELA I: Estudo do esquema de ensaio quanto aos tempos de incubação da fase sólida magnética

Incubação da fase sólida (h)	B ₀ (%)	B ₈₀ (%)	B ₈₀ /B ₀
16	0,19	33,6	177
3	0,12	18,2	152
2	0,10	15,4	154
1	0,09	11,1	123
0,5	0,08	7,6	95

Devido à praticidade de utilizar o esquema de 16h ("overnight") ao invés de incubar o hTSH + ¹²⁵I-mAB por 3 horas, aumentando o tempo de incubação

da fase sólida para mais de 3 horas a fim de se obterem ligações específicas equivalentes às obtidas com o esquema convencional, os experimentos foram realizados utilizando-se o primeiro esquema. Nos casos em que a obtenção do resultado dentro do mesmo dia fosse particularmente necessária, poderia ser utilizado o esquema de 2-3 horas de incubação da fase magnética, cujos B_{60}/B_0 são aproximadamente da mesma ordem.

Quanto aos estudos relacionados à composição do tampão, foram utilizados dois carregadores (BSA ou γ -globulina) adicionados ao tampão de base (NaH_2PO_4 0,05M pH7,4; tween 20 0,5%; azida sódica 0,1%). O efeito obtido sobre as ligações inespecíficas e específicas, quando se utilizou 1% dos carregadores, encontra-se na tabela II.

TABELA II: Efeito da utilização de diferentes carregadores no tampão de ensaio

Carregador	B_0 (%)	B_{60} (%)	B_{60}/B_0
BSA	0,50	34,6	69
γ -globulina	0,45	33,6	75

Devido à BSA apresentar praticamente os mesmos resultados da γ -globulina e por possuir um custo inferior, a primeira proteína possivelmente seria o carregador utilizado nos nossos estudos.

Paralelamente foi estudado o efeito da variação da força iônica do tampão, através da adição de diferentes concentrações de NaCl. Na tabela III são apresentados os resultados deste tipo de experimento, no qual foi utilizado como tampão de base: NaH_2PO_4 0,01M pH7,4; γ -globulina 0,1%; tween 20 0,5%; azida sódica 0,1%.

TABELA III: Efeito da variação da força iônica do tampão de ensaio

NaCl (M)	B₀ (%)	B₆₀ (%)	B₆₀/B₀
0	0,80	37,6	47
0,15	0,62	36,4	59
0,50	0,21	31,4	150
1	0,07	25,9	370

Neste experimento, verifica-se que a utilização de NaCl 1M deve ser realizada com cautela, pois houve uma diminuição indesejável do B₆₀, apesar da melhora considerável do B₀.

Após uma série de avaliações análogas, nas quais foi estudado tanto o tipo e a concentração do carregador como a força iônica do tampão, foi utilizado um tampão composto de NaH₂PO₄ 0,01M pH7,4; NaCl 1M; γ -globulina 0,5%; tween 20 0,5%; azida sódica 0,1%. O desempenho deste tampão pode ser visualizado na tabela IV, em comparação com o tampão utilizado pelo NETRIA (NaH₂PO₄ 0,05M pH7,4; BSA 1%; tween 20 0,5%; azida sódica 0,1%).

TABELA IV: Desempenho de diferentes tampões

Força iônica e carregador do tampão	B₀ (%)	B₆₀ (%)	B₆₀/B₀
NaH ₂ PO ₄ 0,05M BSA 1%	0,85	38,6	45
NaH ₂ PO ₄ 0,01M + NaCl 1M γ -globulina 0,1%	0,62	36,4	59
NaH ₂ PO ₄ 0,01M + NaCl 1M γ -globulina 0,5%	0,23	31,6	137

Apesar dos dados da tabela mostrarem uma melhora significativa do B₀ para os tampões com NaCl e γ -globulina, a diminuição indesejável do B₆₀ observada foi às vezes muito maior, o que comprometeu o emprego destes tampões nas avaliações posteriores. Portanto, os resultados apresentados neste

trabalho foram obtidos com o tampão NETRIA.

As condições de ensaio, definidas quanto ao tempo de incubação e ao tampão, foram utilizadas com o objetivo de identificar uma possível origem da ligação inespecífica (B_0), sendo que os resultados de um primeiro estudo encontram-se na tabela V.

TABELA V: Estudo da origem do B_0 no IRMA magnético de hTSH

Condição de incubação	B_0 (%)	B_{00} (%)	B_{00}/B_0
125I-mAB sem fase sólida	0,04	0,07	1,7
125I-mAB + fase sólida sem anticorpo	1,42	3,42	2,4
125I + fase sólida	0,06	0,05	0,8
125I-BSA + fase sólida	0,03	0,05	1,7
125I-mAB + fase sólida	1,05	31,3	29,8

Este estudo mostra que o B_0 não é causado pelo 125I livre ou pela 125I-BSA algumas vezes presentes mesmo após a purificação do traçador, mas sim exclusivamente pelo 125I-mAB ou um derivado deste e sua interação inespecífica com a matriz magnética, que aparentemente, para apresentar este efeito indesejado, não necessita estar acoplada ao anticorpo de captura.

1.2. Estudo da estocagem e da purificação do traçador

Um fator também muito importante é a estocagem do traçador, por isto foi verificada a influência de diferentes condições de estocagem do 125I-mAB (a -20°C, liofilizado e a 4°C), sobre as ligações inespecífica (B_0) e específica (B_{00}) com o decorrer do tempo (Fig. 1). Na tabela VI, encontra-se a correlação entre tempo de estocagem e B_0 e B_{00} , realizada através de análise por regressão linear.

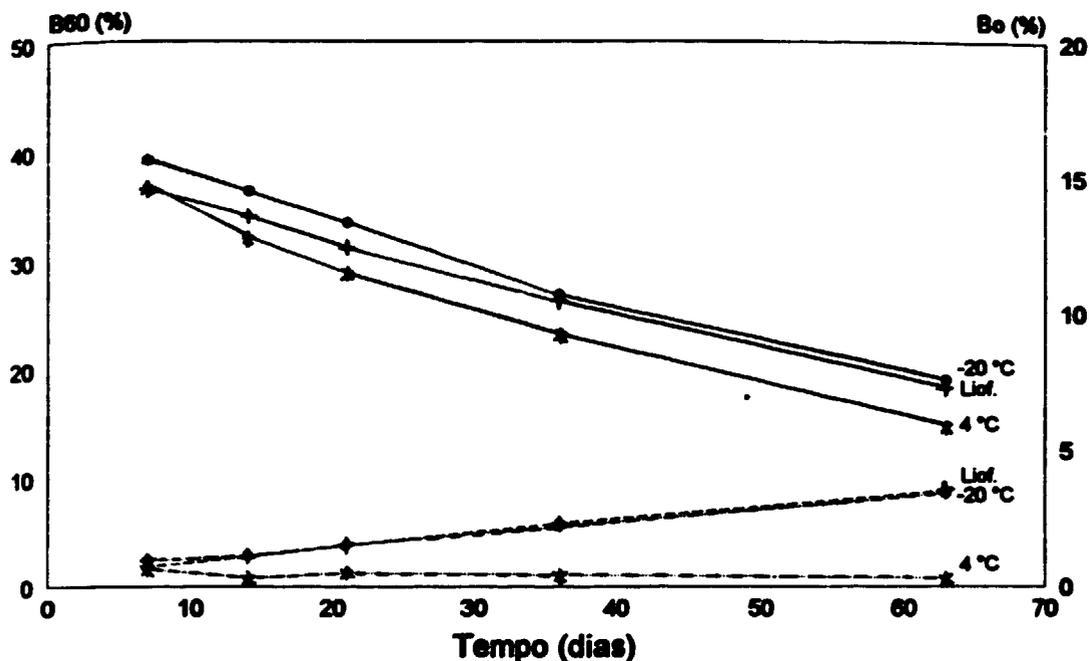


Fig. 1: Ligações específicas (—) e inespecíficas (- - - -) obtidas com o ^{125}I -mAB anti-hTSH estocado em diferentes condições

TABELA VI: Correlação entre tempo de estocagem do ^{125}I -mAB anti- hTSH e B_0 ou B_{60}

Parâmetro	condição de estocagem	inclinação (%/dia)	coeficiente de correlação	nível de significância
B_0	-20°C	0,044	0,9996	$P < 0,001$
	Liof.	0,049	0,9987	$P < 0,001$
	4°C	-0,003	-0,6110	n.s.*
B_{60}	-20°C	-0,364	-0,9955	$P < 0,001$
	Liof.	-0,325	-0,9983	$P < 0,001$
	4°C	-0,379	-0,9896	$P < 0,01$

* n.s. = não significante

As seguintes conclusões podem ser tiradas a partir dos resultados obtidos:

- B_0 aumenta com o tempo da mesma maneira com o traçador congelado ou

liofilizado, enquanto que a estocagem a 4°C não parece influenciar a sua formação;

- B_{60} diminui aproximadamente da mesma maneira nas três condições de estocagem avaliadas. No caso do traçador estocado a 4°C aparentemente houve uma instabilidade inicial mais acentuada e uma correlação menos significativa.

Como o produto congelado e liofilizado apresentaram comportamentos semelhantes, prosseguiram-se os estudos sem utilizar este último tipo de estocagem. Devido a experiências anteriores com outros traçadores, observou-se porém que alterações ocorridas com a mesma cinética de reação, em produto congelado ou em forma liofilizada (estocado a 4°C), são geralmente oriundas do decaimento radioativo, ou seja, de um tipo de reação que não é influenciada pela temperatura (4).

O sistema de purificação do ^{125}I -mAB foi modificado para que houvesse uma melhor separação entre este reagente de interesse e os outros componentes indesejados originados pelo processo de radioiodação (formas alteradas do ^{125}I -mAB, talvez resultantes de um processo de agregação e ^{125}I -BSA). Assim, a coluna de filtração em gel utilizada rotineiramente (Sephadex G-150; 0,9 x 60cm, fluxo = 3,0ml/h) foi substituída por uma coluna de Sephadex G-200 fino (1,5 x 80cm, fluxo = 2,0ml/h) para resolução destas formas de alto peso molecular.

Os perfis cromatográficos resultantes da purificação e repurificação, logo após a marcação, e da repurificação na mesma coluna do traçador estocado a -20°C e a 4°C por dois meses, encontram-se nas Fig. 2,3,4 e 5.

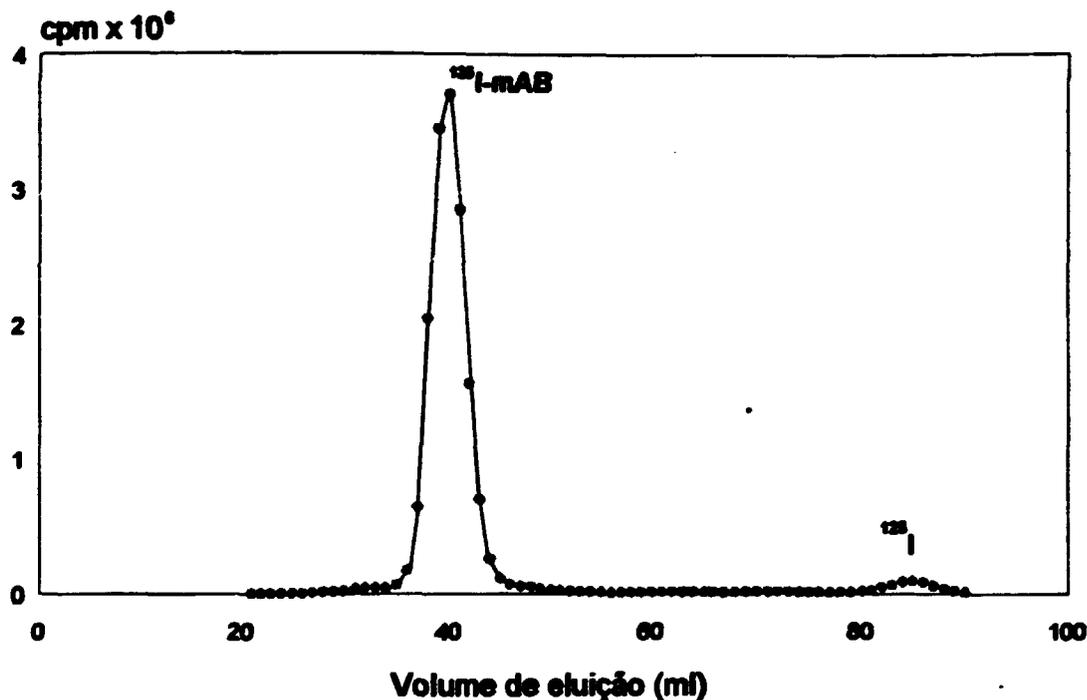


Fig. 2: Perfil cromatográfico da purificação em Sephadex G-200 (1,5 x 80cm; fluxo = 2ml/h) da mistura de marcação

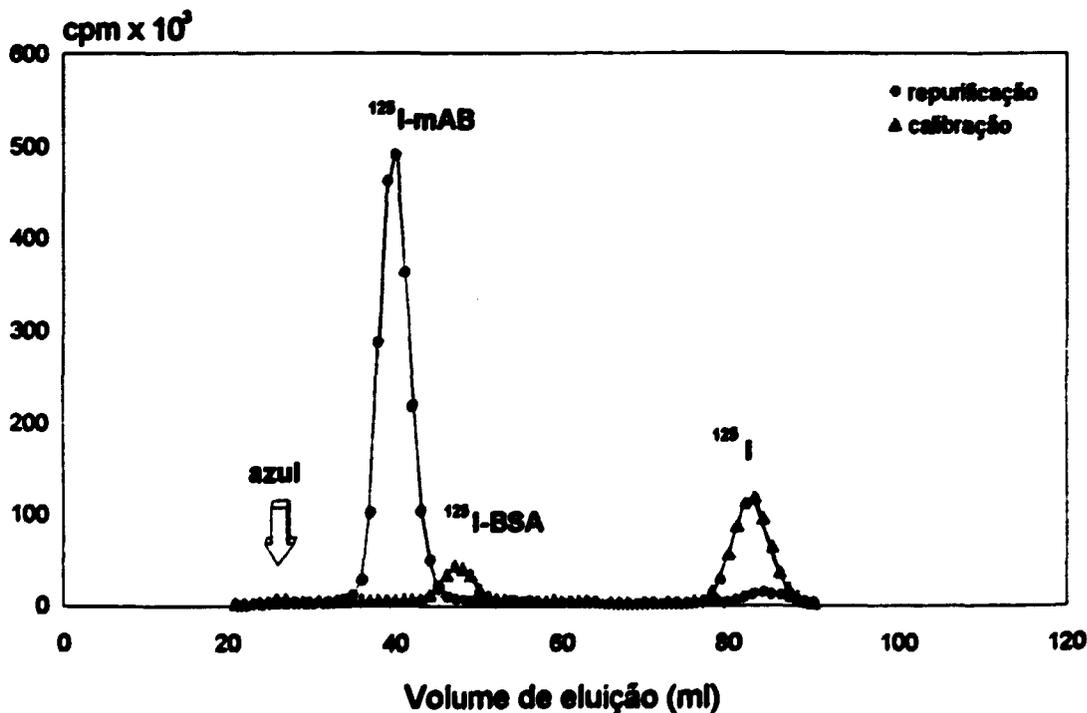


Fig. 3: Repurificação em Sephadex G-200 do ^{125}I -mAB obtido logo após a marcação, para ser utilizado como referência no estudo de estocagem e calibração da mesma coluna com azul dextran, ^{125}I -BSA e ^{125}I

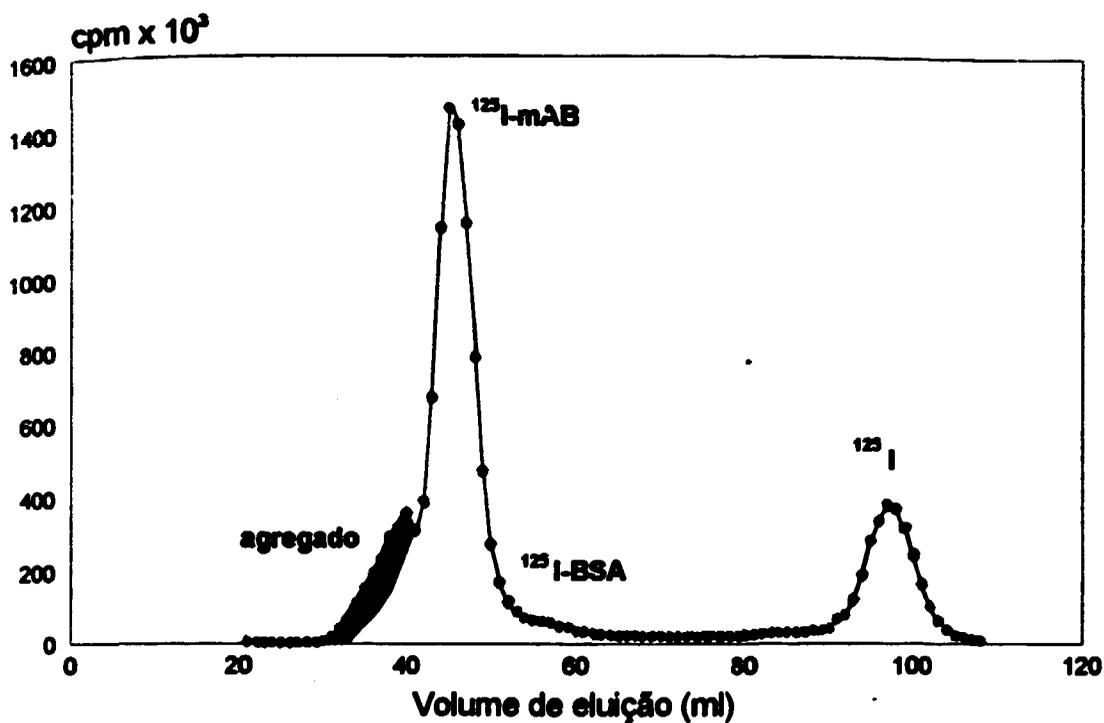


Fig. 4: Repurificação do traçador em Sephadex G-200 após estocagem a -20°C , por dois meses

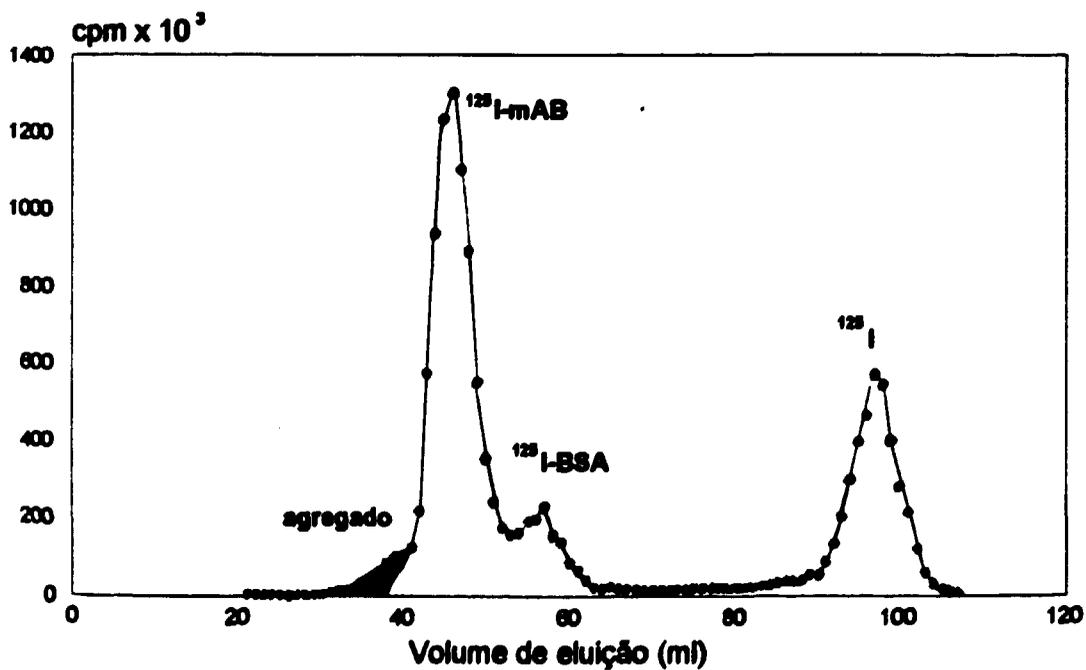


Fig. 5: Repurificação do traçador em Sephadex G-200 após estocagem a 4°C , por dois meses

As porcentagens de cada componente obtido nos cromatogramas das Fig. 2, 4 e 5, em conjunto com as respectivas ligações inespecífica e específica, podem ser observadas na tabela VII. É importante ressaltar a atividade imunológica sempre relacionada com o agregado, o que demonstra inequivocavelmente tratar-se de um derivado de ^{125}I -mAB.

TABELA VII: Porcentagens, sobre a radioatividade total, dos componentes obtidos nos cromatogramas e respectivas ligações inespecífica e específica

Condição do traçador	componente	% do comp.	B ₀ (%)	B ₀₀ (%)
logo após a marcação com 1% de BSA	^{125}I -mAB agregado	0,6	5,4	37,3
	^{125}I -mAB	92,3	0,4	27,6
	^{125}I -BSA	0,5	0,5	6,5
	^{125}I	3,2	—	—
	restante	3,4	—	—
após dois meses de estocagem a -20°C com 1% de BSA	^{125}I -mAB agregado	13,9	2,6	13,4
	^{125}I -mAB	54,9	1,1	13,4
	^{125}I -BSA	2,6	0,5	2,1
	^{125}I	19,4	—	—
	restante	9,2	—	—
após dois meses de estocagem a 4°C com 1% de BSA	^{125}I -mAB agregado	4,2	0,5	10,9
	^{125}I -mAB	49,9	0,2	18,6
	^{125}I -BSA	11,4	0,5	2,1
	^{125}I	23,3	—	—
	restante	11,2	—	—

Após esta série de experimentos, tivemos indicações de que as ligações inespecíficas são provavelmente devidas à presença de formas agregadas de ^{125}I -mAB.

Foram realizadas avaliações análogas para estudar uma possível influência da presença de BSA durante a estocagem do traçador, no sentido de impedir a formação do agregado de ^{125}I -mAB. Nestes experimentos, o anticorpo monoclonal anti-hTSH foi radioiodado na ausência de BSA e purificado na coluna de Sephadex G-200, sendo o produto estocado nas seguintes condições:

- a) -20°C sem BSA;
- b) 4°C sem BSA;
- c) -20°C com 1% de BSA;
- d) 4°C com 1% de BSA.

Após estocagem por 30 dias nestas condições e repurificação na mesma coluna, foram obtidos os cromatogramas apresentados nas Fig. 6-10.

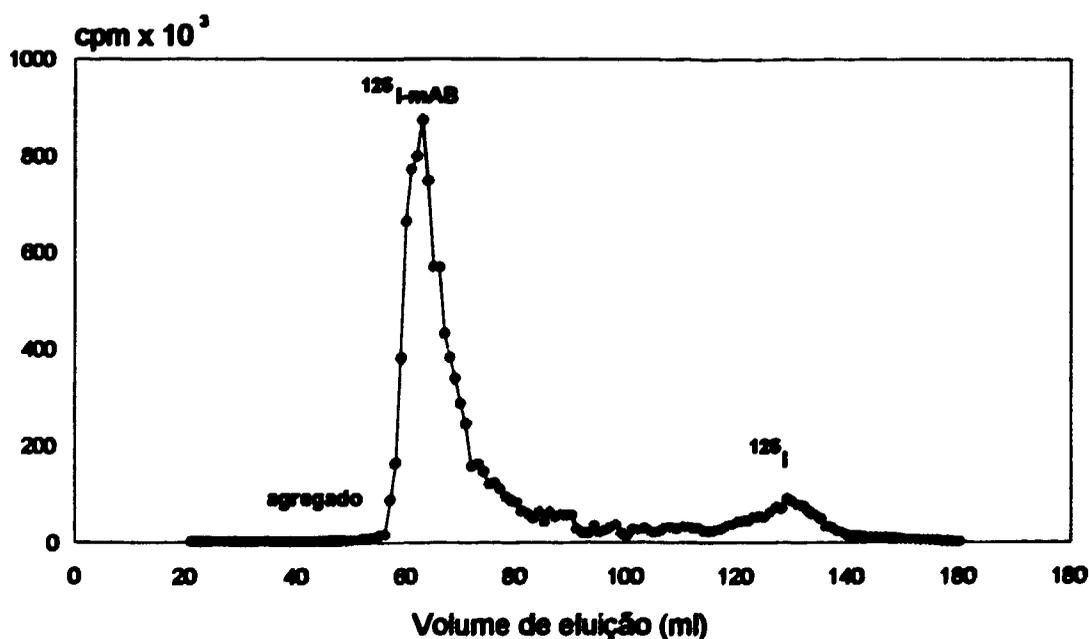


Fig. 6: Perfil cromatográfico em Sephadex G-200 (1,5 x 80cm; fluxo = 2ml/h) da mistura de marcação purificada na ausência de BSA

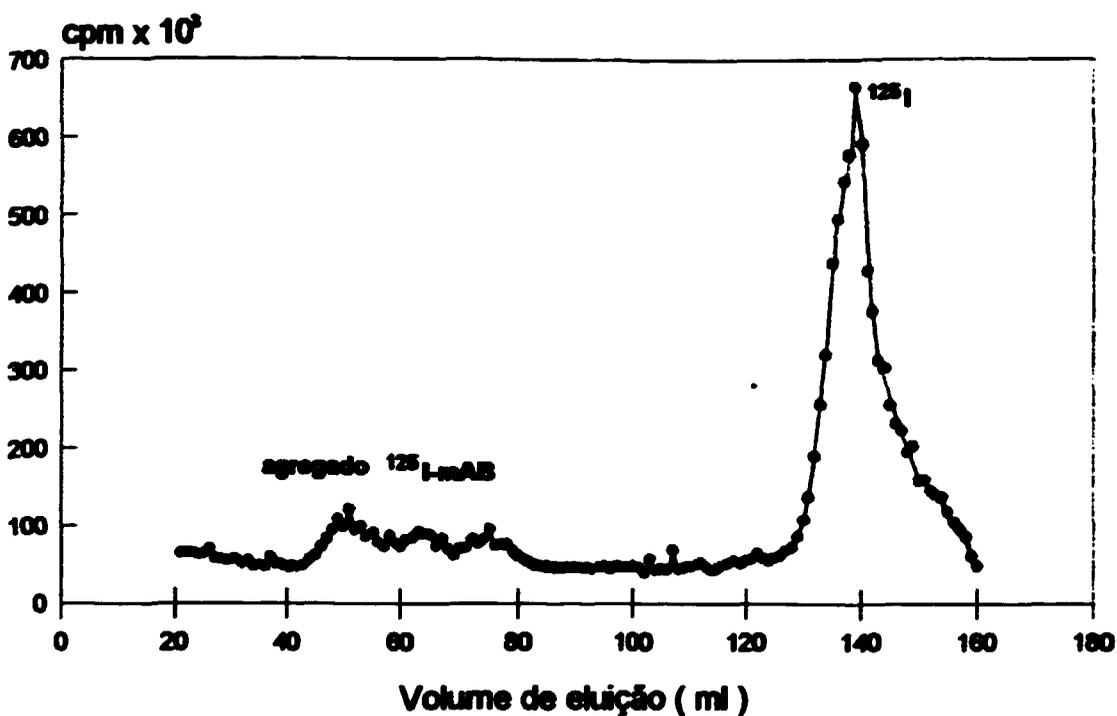


Fig. 7: Repurificação do traçador em Sephadex G-200 após estocagem a -20°C sem BSA, por 1 mês

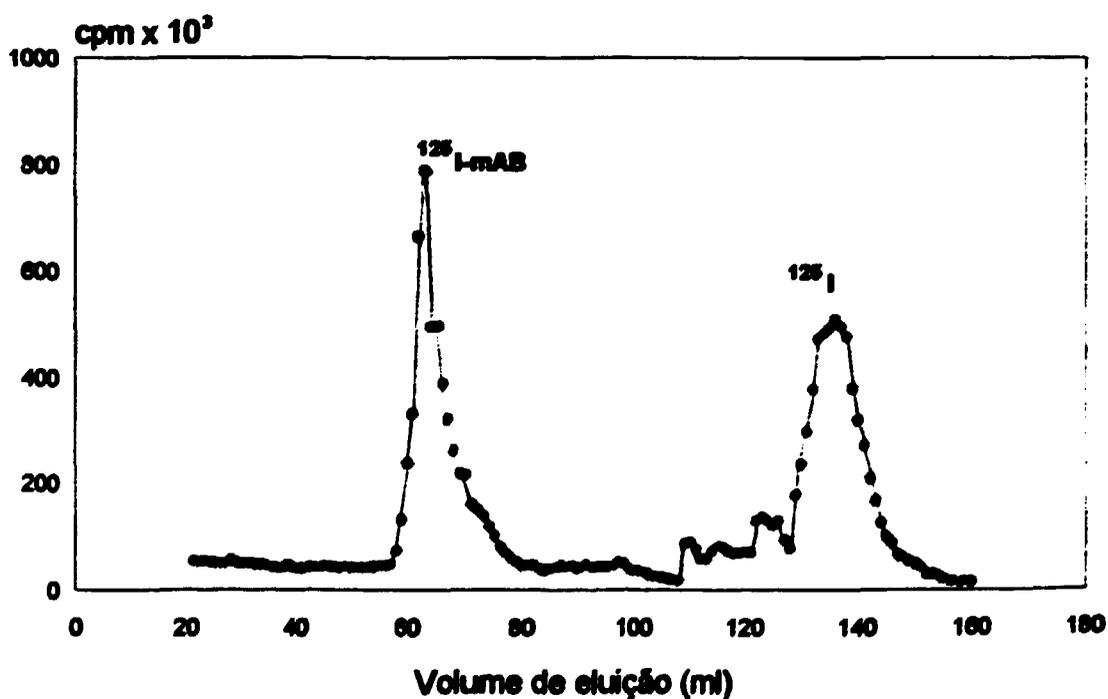


Fig. 8: Repurificação do traçador em Sephadex G-200 após estocagem a 40°C sem BSA, por 1 mês

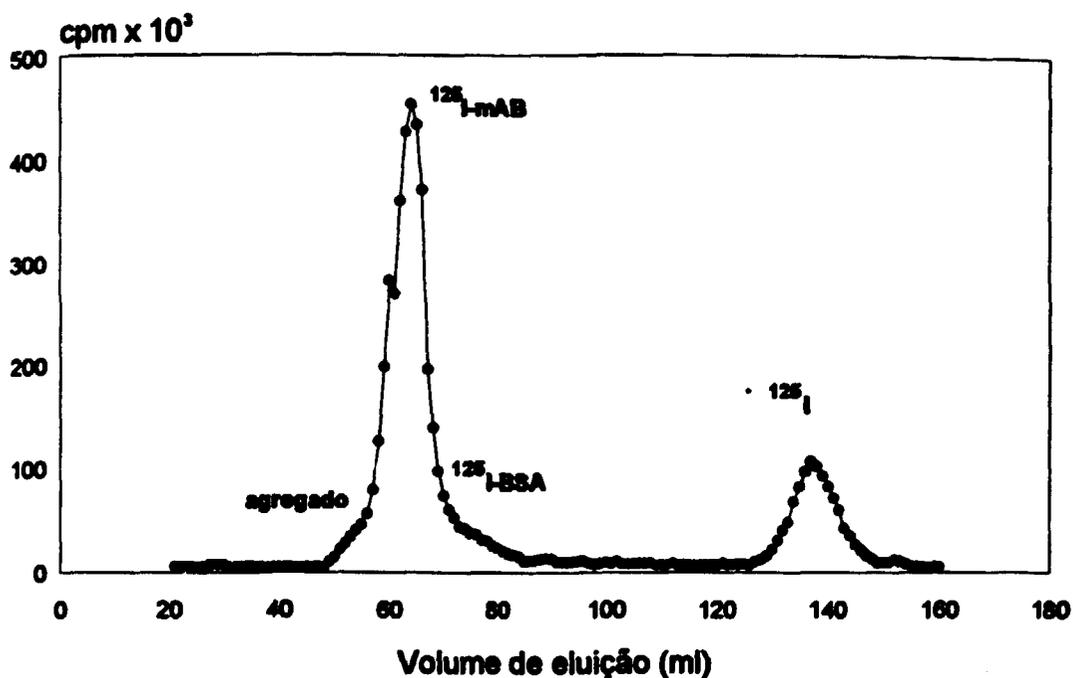


Fig. 9: Repurificação do traçador em Sephadex G-200 após estocagem a -20°C com 1% de BSA, por 1 mês

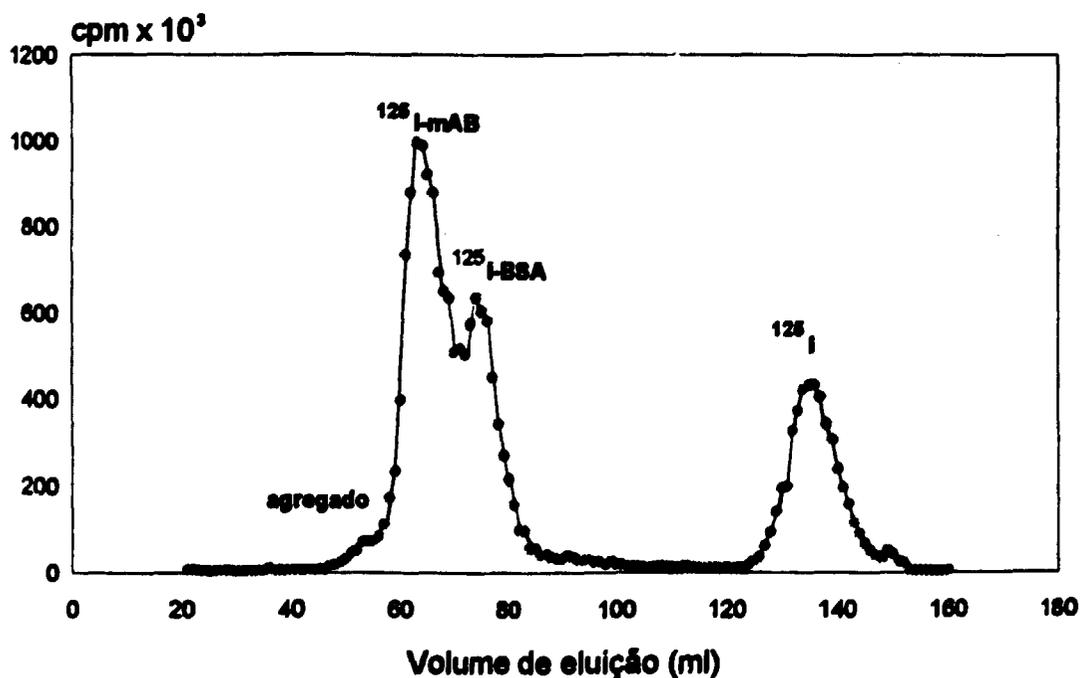


Fig. 10: Repurificação do traçador em Sephadex G-200 após estocagem a 40°C com 1% de BSA, por 1 mês

Na tabela VIII, encontram-se as porcentagens de cada componente obtido nestes últimos cromatogramas.

TABELA VIII: Porcentagens, sobre a radioatividade total, dos componentes obtidos nos cromatogramas do ^{125}I -mAB radiiodado na ausência de BSA e estocado sob diferentes condições

Componente	% dos componentes logo após a marcação	-20°C	4°C sem	-20°C com	4°C com
		sem BSA	BSA	BSA	BSA
125I-mAB	0,3	6,9	0	6,8	1,9
agregado					
125I-mAB	77,0	7,5	36,5	51,2	47,7
125I-BSA	0	0	0	4,9	17,6
125I	9,9	55,0	35,1	22,3	24,0
restante	12,8	30,6	28,4	14,8	8,8

Na ausência de BSA ocorre um "espalhamento" dos componentes radiiodados pela coluna, fato este observado tanto pela visualização dos cromatogramas obtidos nesta condição (Fig. 6-8), como quando se compara as porcentagens das frações eluídas em posições não características dos componentes conhecidos (identificadas nas tabelas VII e VIII como fração restante). Este fenômeno pode ser observado nas marcações realizadas na presença de BSA (tabela VII: fração restante = 3,4%) e na ausência de BSA (tabela VIII: fração restante = 12,8%), ou comparando-se estas frações na tabela VIII para as diferentes estocagens realizadas, onde as mesmas são maiores para as estocagens realizadas na ausência de BSA (30,6 e 28,4%) do que na presença de BSA (14,8 e 8,8%).

Devido a este "espalhamento" dos componentes pela coluna, torna-se difícil a caracterização adequada dos mesmos. Apesar desta dificuldade, observa-se principalmente na estocagem a -20°C uma influência determinante da ação protetora da BSA, pois na ausência desta ocorre uma destruição quase completa do ^{125}I -mAB após 1 mês da marcação, restando apenas 7,5% do mesmo, sendo que a maior parte da radioatividade é liberada na forma de ^{125}I (55,0%).

Por outro lado, foi novamente verificada a relação entre estocagem a -20°C e formação do ¹²⁵I-mAB agregado, cujas porcentagens foram de 6,9 e 6,8% sem e com BSA respectivamente, ou seja, maiores que as obtidas na estocagem a 4°C: 0 e 1,9% sem e com BSA respectivamente. Portanto, não ficou demonstrada nenhuma influência da BSA sobre a formação do agregado de ¹²⁵I-mAB.

Conseqüentemente, tendo sido comprovado que a forma agregada de ¹²⁵I-mAB aumenta as ligações inespecíficas, foram em seguida realizados vários experimentos utilizando diferentes recursos, com o objetivo de diminuir a presença ou a influência de tal componente.

2. MINIMIZAÇÃO DA LIGAÇÃO INESPECÍFICA

2.1. Repurificação do traçador

Numa análise inicial do traçador repurificado após estocagem a -20°C por 27 dias, foram obtidas as porcentagens de ligação de B_0 e de B_{80} relacionadas na tabela IX.

TABELA IX: Comportamento do traçador estocado a -20°C por 27 dias, após repurificação em Sephadex G-200

Condição do traçador	B_0 (%)	B_{80} (%)	B_{80}/B_0
traçador recém-marcado	0,20	37,4	187
traçador com 27 dias de estocagem	1,54	26,7	17
4 dias após repurif.	0,67	32,4	48
5 dias após repurif.	0,70	33,3	48
7 dias após repurif.	0,80	34,4	43

A repurificação do traçador é bastante efetiva, não somente pelo fato de diminuir o B_0 , mas também por restabelecer os valores de B_{80} . Os níveis de B_0 porém não chegam a valores muito baixos e voltam em breve tempo aos níveis originais.

Foram ainda realizadas incubações das frações eluídas correspondentes ao ^{125}I -mAB para verificação do comportamento das ligações específicas e inespecíficas. Na Fig. 11, encontra-se o perfil obtido na repurificação em Sephadex G-200 (2,5 x 50cm; fluxo=12ml/h) de um traçador estocado a -20°C por 36 dias, juntamente com uma representação das porcentagens de B_0 e de B_{80} obtidas com a utilização das respectivas frações.

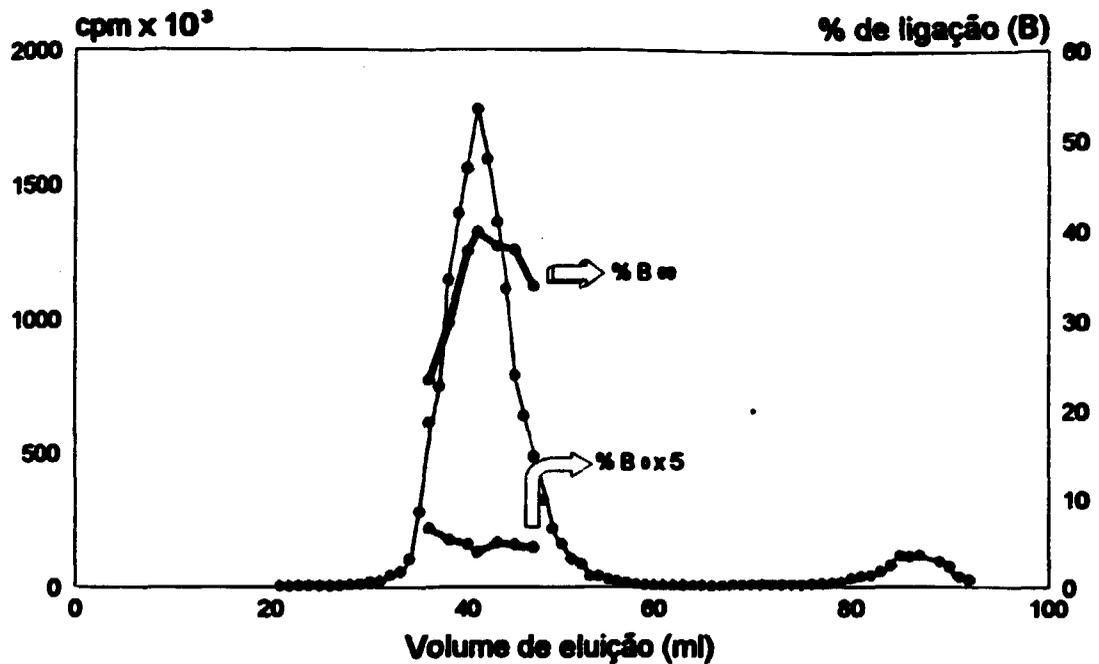


Fig. 11: Perfil da repurificação do traçador em Sephadex G-200 (2,5 x 50cm; fluxo=12ml/h) após estocagem a -20°C por 36 dias, com representação das porcentagens de B_0 e de B_{00} obtidas para as respectivas frações de ^{125}I -mAB incubadas

Neste estudo, torna-se claro que o melhor desempenho do sistema corresponde às incubações das frações centrais do pico de ^{125}I -mAB, onde são obtidas as ligações inespecíficas mais baixas e as específicas mais altas. Mais uma vez é evidente que as ligações inespecíficas se encontram na região de alto peso molecular.

2.2. "Limpeza" do traçador

O efeito da incubação prévia do traçador com a matriz magnética não acoplada (definida por nós como "limpeza") foi inicialmente estudado com o ^{125}I -mAB estocado a -20°C por 16 dias. Esta primeira incubação foi realizada sem uma padronização prévia, sendo que as condições de "limpeza" escolhidas aleatoriamente foram as seguintes: 50 μl do traçador + 5mg da partícula magnética não acoplada (100 μl) + 350 μl de tampão NaH_2PO_4 0,05M pH7,4; azida sódica 0,1%; incubados por 16 horas ("overnight") a temperatura ambiente, sob agitação. Os resultados obtidos encontram-se na tabela X.

TABELA X: Efeito da "limpeza" do traçador estocado a -20°C por 16 dias

Condição de incubação do traçador	B_0 (%)	B_{60} (%)	B_{60}/B_0
sem "limpeza"	1,2	34,7	29
com "limpeza"	0,2	33,6	168

Observa-se que este processo de "limpeza" do traçador pode ser de grande utilidade, pois houve uma diminuição acentuada do B_0 e uma manutenção do B_{60} , com a utilização de uma operação extremamente simples e prática. Portanto, foi realizada uma padronização do método, visando principalmente economia de partícula magnética não acoplada e do tempo gasto nesta etapa.

Para a padronização, utilizaram-se 50 μl de um traçador estocado a -20°C por 22 dias, sendo inicialmente avaliada a quantidade de partícula magnética utilizada (tabela XI).

TABELA XI: Influência da quantidade de partícula magnética utilizada na "limpeza" do traçador

Condição de incubação do traçador	B ₀ (%)	B ₆₀ (%)	B ₆₀ /B ₀
sem "limpeza"	1,52	32,5	21
"limpeza" com 1mg de partícula magnética	0,85	29,6	35
"limpeza" com 2,5mg de partícula magnética	0,59	28,6	48
"limpeza" com 5mg de partícula magnética	0,42	25,2	60
"limpeza" com 10 mg de partícula magnética	0,24	15,6	65

Além da diminuição do B₀ em conjunto com a manutenção do B₆₀, a economia de partícula magnética foi também considerada como um fator de grande importância. Portanto, decidiu-se utilizar 2,5mg de partícula magnética para a "limpeza" do traçador.

A seguir, foi estudado o parâmetro "tempo de limpeza" com o ¹²⁵I-mAB anti-hTSH estocado a -20°C por 28 dias (tabela XII).

TABELA XII: Influência do "tempo de limpeza" do traçador

Condição de incubação do traçador	B ₀ (%)	B ₆₀ (%)	B ₆₀ /B ₀
sem "limpeza"	1,56	28,7	18
"limpeza" por 2h	0,73	28,1	38
"limpeza" por 4h	0,69	27,9	40
"limpeza" por 6h	0,67	26,7	40
"limpeza" por 8h	0,64	26,4	41
"limpeza" por 16h	0,56	25,8	46

A partir deste experimento, ficou padronizada a utilização de 4h para a "limpeza" do traçador, visto que num curto período de tempo foi obtida uma

considerável diminuição do B_0 sem alteração significativa do B_{60} .

A quantidade de traçador utilizado na "limpeza" foi outro fator estudado (tabela XIII), com um ^{125}I -mAB estocado a -20°C por 28 dias.

TABELA XIII: Influência da quantidade de traçador utilizado na "limpeza"

Condição de incubação do traçador	B_0 (%)	B_{60} (%)	B_{60}/B_0
sem "limpeza"	1,56	28,7	18
"limpeza" com 50 μl de traçador	0,45	26,5	59
"limpeza" com 100 μl de traçador	0,56	26,7	48
"limpeza" com 250 μl de traçador	0,73	27,4	38

Neste experimento observa-se a existência de uma quantidade ideal de traçador, que deve ser utilizada para que o sistema apresente o melhor desempenho. Para o nosso esquema, a quantidade ótima foi de 50 μl de traçador, que em geral correspondem a $5-10 \times 10^6\text{cpm}$.

Foi também estudada a composição do tampão empregado durante a "limpeza", quanto à presença de BSA, pH e força iônica do mesmo. Os resultados deste estudo encontram-se na tabela XIV, onde foi utilizado um traçador estocado a -20°C por 34 dias.

TABELA XIV: Escolha do melhor tampão de "limpeza"

Tampão utilizado na "limpeza"	B_0 (%)	B_{60} (%)	B_{60}/B_0
sem "limpeza"	1,57	25,5	16
NaH_2PO_4 0,05M pH7,4	0,61	24,4	40
NaH_2PO_4 0,05M pH7,4; BSA 1%	1,13	25,8	23
NaH_2PO_4 0,05M pH8,0	0,74	24,9	34
NaH_2PO_4 0,05M pH7,4; NaCl 1M	1,29	24,8	19

obs: os tampões contêm azida sódica 0,1%

Após a escolha do tampão NaH_2PO_4 0,05M pH7,4; azida sódica 0,1% em conjunto com as melhores condições obtidas (50 μl de traçador + 2,5mg de

partícula magnética + 400 μ l do tampão, incubação sob agitação por 4h a temperatura ambiente), foi realizada a "limpeza" de um traçador estocado a 4°C por 4 dias. O resultado obtido após a padronização deste procedimento é apresentado na tabela XV.

TABELA XV: Efeito da "limpeza" do traçador estocado a 4°C por 4 dias

Condição de incubação do traçador	B ₀ (%)	B ₆₀ (%)	B ₆₀ /B ₀
sem "limpeza"	0,26	34,1	131
com "limpeza"	0,16	33,7	211

Portanto, a "limpeza" do traçador foi efetiva mesmo quando o ¹²⁵I-mAB é recém-marcado (4 dias) e estocado adequadamente (4°C).

2.3. Adição de soro

Nas avaliações realizadas para identificar a origem e natureza química da ligação inespecífica, foi propositalmente omitida a adição de soro na incubação para eliminar interferências que mascarariam os resultados.

Considerando que a utilização de soro ocorre aleatoriamente na literatura, sendo empregado em concentrações que variam bastante ou até sendo omitido, a influência deste componente sobre o desempenho do ensaio foi primeiramente estudada (tabela XVI) com o traçador estocado a -20°C, utilizando-se 20% de soro equino (100 μ l num volume total de incubação de 500 μ l, como na rotina laboratorial).

TABELA XVI: Estudo do efeito da adição de soro com traçador estocado a -20°C por 16 dias

Condição de incubação	B ₀ (%)	B ₆₀ (%)	B ₆₀ /B ₀
sem soro	1,20	34,2	29
com soro	0,12	24,6	205

O resultado obtido indica que há um efeito extremamente positivo do soro quanto à diminuição do B₀, mas a simultânea diminuição indesejável do B₆₀ fez com que nós realizássemos esta adição com cautela. Uma possível interpretação deste fenômeno parece ser a seguinte: o soro, na sua enorme heterogeneidade, contém moléculas que competiriam com o ¹²⁵I-mAB agregado para ligarem-se inespecificamente à matriz magnética, diminuindo as ligações inespecíficas; ao mesmo tempo outras moléculas competiriam com o mesmo traçador pela ligação ao hTSH, diminuindo as ligações específicas (32).

Após a decisão de que a melhor condição de estocagem do traçador seria a 4°C, utilizou-se esta condição para a realização de um estudo com várias concentrações de soro (tabela XVII).

TABELA XVII: Variação da concentração de soro no ensaio com traçador estocado a 4°C por 4 dias

% de soro	B ₀ (%)	B ₆₀ (%)	B ₆₀ /B ₀
0	0,26	34,1	131
1	0,20	32,4	162
5	0,14	32,4	231
10	0,14	30,5	218
20	0,12	27,4	228

A partir deste ensaio, ficou padronizado que a concentração de soro por nós utilizada nas curvas dose-resposta de hTSH seria de pelo menos 5%.

2.4 Combinação de diferentes métodos utilizados para diminuir a ligação inespecífica

A combinação dos tratamentos dispensados ao traçador (repurificação e "limpeza") em conjunto com a adição de soro, proporcionou um aumento do desempenho do sistema IRMA magnético, principalmente quanto às ligações inespecíficas, como pode ser observado pela tabela XVIII.

TABELA XVIII: Combinação de diferentes tratamentos realizados para diminuir o B_0

Condição do traçador	B_0 (%)	B_{60} (%)	B_{60}/B_0
somente repurif.	0,80	34,4	43
repurif. + "limpeza"	0,30	35,9	120
repurif. + soro	0,03	25,6	853
repurif. + "limpeza" + soro	0,01	27,1	2710

obs: traçador estocado a -20°C por 27 dias; repurificação na coluna de Sephadex G-200

É necessário ressaltar que o alto valor de B_{60}/B_0 obtido com $B_0=0,01\%$ não reflete um desempenho correspondente. De fato, abaixo de $B_0=0,05\%$ (aproximadamente 30cpm) achamos estes valores muito aleatórios, resultando numa razão sinal-ruído desproporcionadamente alta.

2.5. Filtração e centrifugação do traçador

Considerando que as ligações inespecíficas parecem estar relacionadas com uma forma agregada de ^{125}I -mAB, a filtração e a centrifugação do traçador foram utilizadas para tentar diminuir a influência destas formas e ao mesmo tempo demonstrar a hipótese sugerida.

A filtração através de membranas Millipore, de um traçador estocado a -

20°C por 32 dias resultou numa considerável diminuição do B_0 , como mostra a tabela XIX.

TABELA XIX: Efeito da filtração do traçador

Traçador	B_0 (%)	B_{60} (%)	B_{60}/B_0
não filtrado	1,80	34,6	19
filtrado	0,72	31,0	43

Quanto à centrifugação do ^{125}I -mAB, os resultados obtidos encontram-se na tabela XX, sendo que foi utilizada uma preparação estocada a -20°C por 42 dias.

TABELA XX: Efeito da centrifugação do traçador

Traçador	B_0 (%)	B_{60} (%)	B_{60}/B_0
não centrifugado	2,16	24,4	11
centrifugado*	1,95	24,6	13

*utilização do sobrenadante

Devido à dificuldade de demonstrar a significância desta limitada diminuição de B_0 apresentada na tabela, o ensaio foi repetido três vezes, obtendo-se sempre um decréscimo do B_0 da mesma ordem (9,7%, 10,3%, 11,2%). Este procedimento não foi utilizado posteriormente na construção das curvas dose-resposta, por não ser tão efetivo quanto os demais métodos. O mesmo vale para a filtração através de membrana Millipore que resultou também em maior instabilidade do traçador quanto às ligações específicas. Contudo, os dois tipos de experimento contribuíram para reforçar a hipótese da ligação inespecífica ser produzida por uma forma agregada do traçador.

2.6. Saturação da fase sólida durante o acoplamento e sua posterior lavagem

Com a adição de BSA e de leite, durante a lavagem da fase sólida magnética, verificou-se um efeito de saturação da mesma com conseqüente diminuição do B_0 . Na tabela XXI, pode-se observar o efeito dessa lavagem, quando se utilizaram 2mg/tubo de fase sólida.

TABELA XXI: Efeito da saturação da fase sólida com BSA e leite

Acoplamento	saturação da fase sólida	B_0 (%)	B_{60} (%)	B_{60}/B_0
1	sem BSA/leite	0,78	29,5	38
	com BSA + leite	0,17	28,3	166
2	com BSA + leite	0,25	38,2	153
	somente BSA	0,67	38,5	57
	somente leite	0,24	36,4	152

De acordo com os dados obtidos, concluiu-se que as proteínas do leite são efetivamente as responsáveis pelo maior efeito de saturação da fase sólida. Assim, a lavagem com BSA e leite foi introduzida como procedimento de rotina na preparação da fase sólida.

Quanto à lavagem da fase sólida antes do ensaio, esta tem como finalidade a remoção de moléculas de anticorpo íntegras ou não, que desacoplam-se da matriz magnética, principalmente quando este reagente é estocado por longos períodos após o acoplamento. Com a lavagem, verifica-se um aumento do B_{60} (tabela XXII).

TABELA XXII: Estudo da lavagem da fase sólida magnética (FSM)

Condição do traçador	FSM não lavada			FSM lavada		
	B_0 (%)	B_{60} (%)	B_{60}/B_0	B_0 (%)	B_{60} (%)	B_{60}/B_0
traçador com 21 dias estocado a -20°C	0,18	22,7	126	0,12	30,8	257
traçador com 36 dias estocado a -20°C	0,18	18,9	105	0,25	27,3	109
traçador com 36 dias estocado a 4°C	0,05	16,8	336	0,08	23,5	293

obs: incubações realizadas com adição de 20% de soro

3. OBTENÇÃO DE CURVAS DE hTSH ULTRA-SENSÍVEIS UTILIZANDO UM SISTEMA OTIMIZADO

Durante os estudos relativos às ligações inespecíficas, foram realizadas várias curvas dose-resposta em duplicata (n=2) ou quadruplicata (n=4) das doses zero e 0,3 mUI/L de hTSH, sendo as demais doses de padrão e os controles utilizados em duplicata. Alguns exemplos das condições utilizadas e dos parâmetros obtidos podem ser observados na tabela XXIII.

TABELA XXIII: Condições utilizadas e alguns parâmetros relativos a exemplos de curvas dose-resposta

Ensaio	Condições	B ₀ (%)	B ₈₀ (%)	inclin. inicial (cpm x L/mUI)	sensib.*1 (mUI/L)
1	traçador com 36 dias	1,47	23,6	225	0,87
1'	repurificação + "limpeza" + soro	0,02	26,0	295	0,06
2	traçador com 9 dias	0,85	35,3	582	0,14
2'	"limpeza" + soro	0,04	22,2	293	0,31
3	traçador com 55 dias	1,17	30,4	417	0,13
3'	soro	0,05	22,6	455	0,02

*1- cálculo utilizando n=2 (1/1'e 2/2') e n=4 (3/3') replicatas das doses zero e 0,3 mUI/L, de acordo com a definição de Rodbard

obs.: as incubações 1', 2' e 3' foram realizadas com adição de 20% de soro

Nestes experimentos, os traçadores ainda estavam sendo estocados a -20°C, o que explica os valores altos de B₀ obtidos.

A sensibilidade foi calculada apenas pelo método de Rodbard, utilizado rotineiramente no laboratório até o presente momento. Os resultados indicam que este parâmetro parece ser diretamente influenciado por B₀ baixos. Um exemplo deste fato são os valores de sensibilidades obtidos de 0,06 e 0,02mUI/L de hTSH

correspondentes a B_0 de 0,02 e 0,05% respectivamente. Uma exceção é o ensaio 2', onde provavelmente o baixo número de replicatas ($n=2$) utilizado e uma inexplicável queda da inclinação inicial comprometeram a sensibilidade. Conseqüentemente, foram programadas outras avaliações relativas à sensibilidade do sistema, nas quais procurou-se manter a ligação inespecífica nos menores valores possíveis, através dos métodos já descritos.

Nos ensaios seguintes, as curvas foram construídas com multireplicatas ($n=20$) das doses zero e 0,3 mUI/L de hTSH. A finalidade principal foi obter dados suficientes que possibilitassem a comparação da sensibilidade do nosso IRMA magnético com os melhores sistemas magnéticos descritos, com outros ensaios de segunda geração ou mesmo com sistemas não isotópicos de terceira geração. Em todos estes sistemas, os valores declarados foram calculados a partir de multireplicatas, como relatado na literatura, apesar de na prática laboratorial serem normalmente realizados em duplicata.

Assim, a repurificação e "limpeza" do traçador, a adição de soro (5%) e a lavagem da fase sólida foram empregadas quando necessário, de acordo com o decaimento radioativo do traçador e o conseqüente aumento do B_0 . A repurificação do traçador foi realizada em Sephadex G-25, devido a maior praticidade e rapidez deste sistema de purificação, quando se deseja apenas separar o ^{125}I -mAB do ^{125}I que vai sendo liberado durante a estocagem, aumentando assim as ligações específicas, enquanto as inespecíficas são suficientemente reduzidas com os outros tratamentos.

Na tabela XXIV, podemos observar as sensibilidades obtidas com traçadores que apresentam diferentes níveis de B_0 . Nos ensaios 1-4 foram utilizados os métodos para diminuir o B_0 (sistema otimizado), nos quais a preparação de ^{125}I -mAB foi sempre a mesma estocada a 4°C por 60 dias. Enquanto nos demais ensaios (5-8 e 9-12) esses métodos não foram utilizados (sistema não otimizado) e as ligações inespecíficas maiores foram devidas às diferentes condições de estocagem das preparações de traçador.

TABELA XXIV: Sensibilidades obtidas com traçadores que apresentam diferentes níveis de B_0

Ensaio	B_0 (%)	B_0 (cpm)	inclín. inicial (cpm x L/mUI)	sensib.funacional (mUI/L)* ¹	sensib. analítica (mUI/L)	
					A ²	B ³
1	0,09	55,3	667		0,024	0,008
2	0,10	62,4	550		0,018	0,008
3	0,06	38,6	508	0,05	0,018	0,009
4	0,09	68,8	516		0,030	0,012
5	0,36	218	356		0,096	0,053
6	0,45	294	557		0,048	0,016
7	0,65	420	576	0,27	0,072	0,021
8	0,66	422	486		0,072	0,021
9	0,86	714	530		0,096	0,033
10	1,13	832	397		0,240	0,079
11	1,11	724	526	0,48	0,144	0,048
12	1,0	582	417		0,120	0,034

*¹-cálculo utilizando CV=20% obtido do perfil de imprecisão inter-ensaio (n=4) para cada nível de B_0 avaliado

*²-cálculo realizado utilizando n=20 replicatas da dose zero de hTSH + 2DP

*³-cálculo realizado utilizando n=20 replicatas das doses zero e 0,3 mUI/L de hTSH, de acordo com a definição de Rodbard

Um exemplo da diferença existente no perfil da curva dose-resposta para os sistemas otimizado e não otimizados é mostrado na Fig. 12.

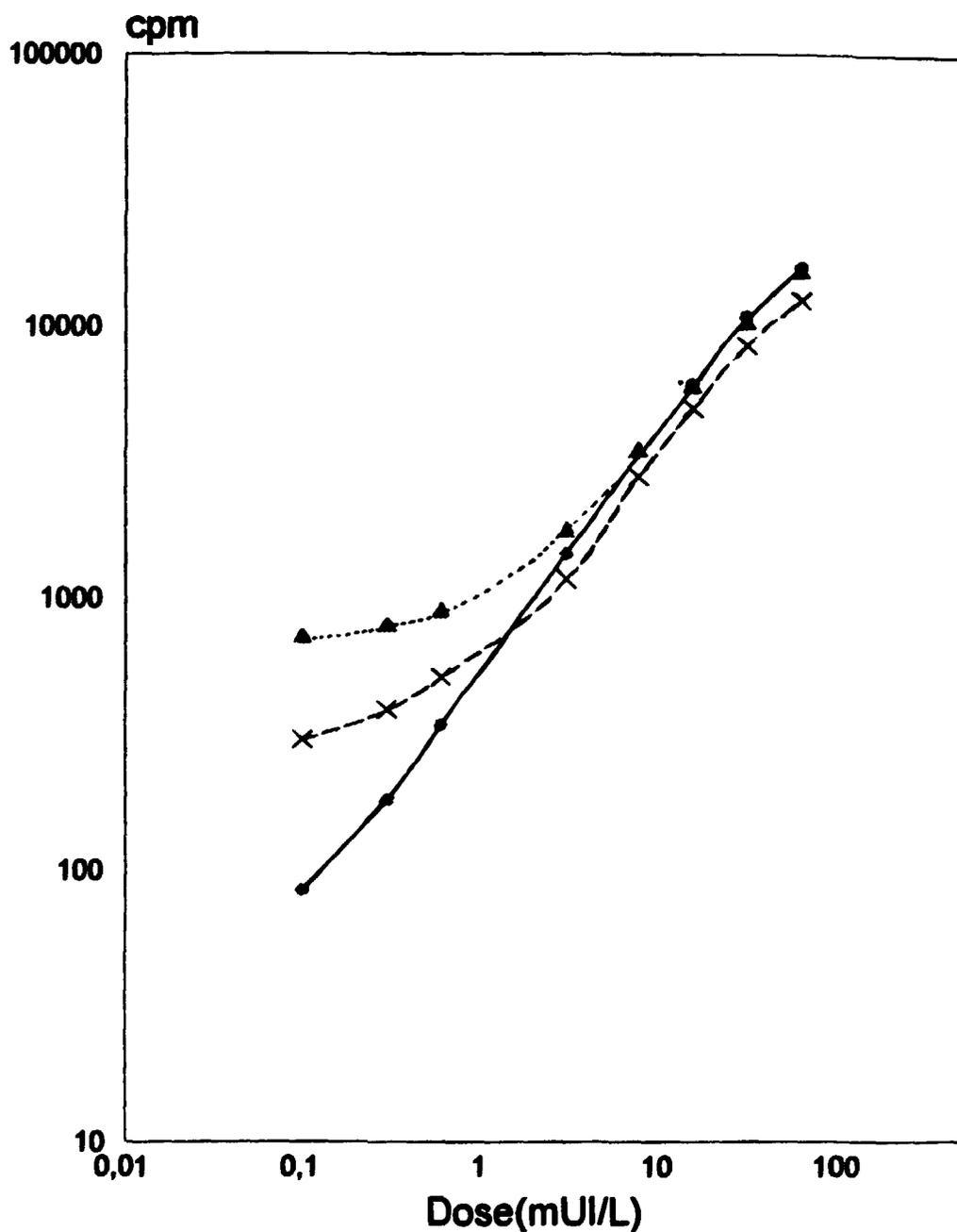


Fig. 12: Exemplos de curvas dose-resposta para IRMA de hTSH obtidas para os sistemas otimizado (— ensaio 3) e não otimizados (- - - - - ensaio 5 e ensaio 11)

Os perfis de imprecisão inter-ensaios ($n=4$) obtidos a partir das curvas dose-resposta, que apresentam diferentes níveis de B_0 , utilizando replicatas intra-ensaio $n=2$ são mostrados na Fig. 13.

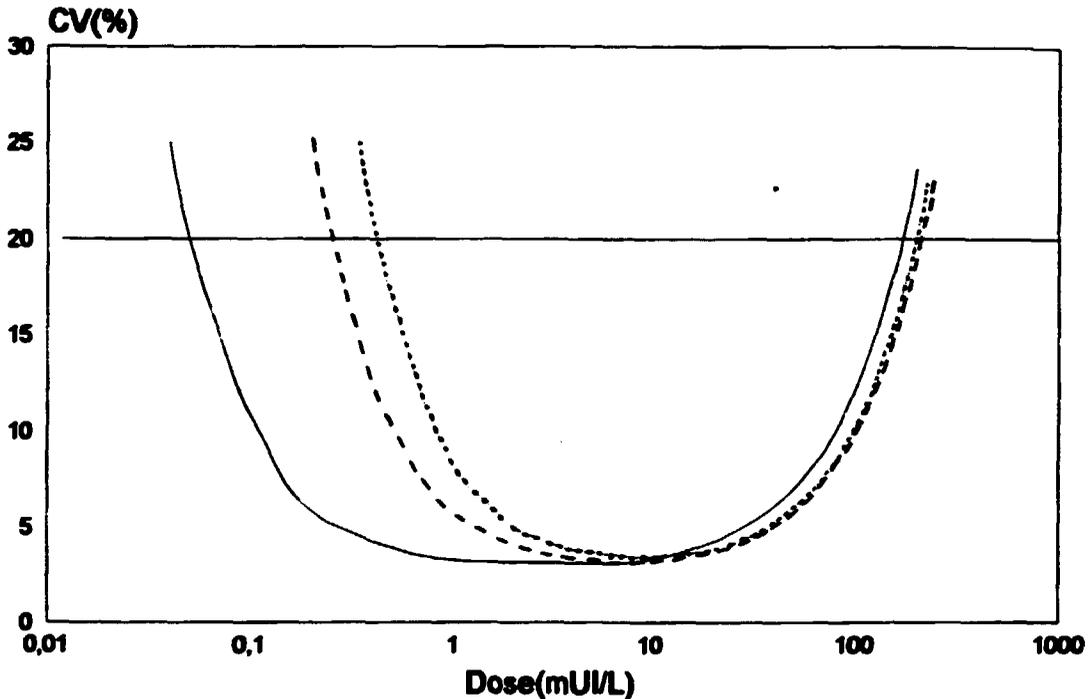


Fig. 13: Perfis de imprecisão obtidos a partir das curvas dose-resposta relativas a diferentes níveis de B_0 , utilizados para o cálculo da sensibilidade funcional do sistema. Ensaios 1-4 (———), ensaios 5-8 (- - - - -) e ensaios 9-12 (.....)

Para validar os ensaios realizados, foram utilizados 3 pools de soro como controles de qualidade do sistema. Os valores médios desses soros juntamente com os respectivos CV, encontram-se na tabela XXV.

TABELA XXV: Valores obtidos para as amostras controle de qualidade nos vários ensaios realizados com diferentes níveis de B_0

Ensaios	CQ-B \pm CV	CQ-M \pm CV	CQ-A \pm CV
1-4	1,8 \pm 5,3	3,6 \pm 5,7	23,3 \pm 7,3
5-9	1,1 \pm 22,3	3,1 \pm 13,2	22,8 \pm 14,8
9-12	0,3 \pm 61,2	2,2 \pm 7,9	23,5 \pm 1,7

De acordo com os intervalos determinados para esses pools (ver

Métodos), verifica-se que não é possível determinar o CQ-B nos ensaios com B_0 mais elevados (9-12). Nestes mesmos ensaios, o CQ-M também não pode ser determinado confiavelmente, pois se encontra muito próximo do limite inferior do intervalo de trabalho fornecido pelo perfil de imprecisão.

Com a realização deste tipo de estudo, ou seja, curvas em multireplicata, são evidenciadas vantagens da utilização do sistema otimizado. Na Fig. 12, a comparação entre as curvas dose-resposta, permite observar que existe uma inclinação maior entre as doses 0 e 0,3mU/L de hTSH; na curva otimizada, o que resulta diretamente numa maior possibilidade de discriminação entre valores baixos de hTSH. Como sabemos, a inclinação está diretamente relacionada com o cálculo da sensibilidade pelos métodos analíticos que utilizam multireplicatas da dose zero $\pm 2DP$ ou pela formulação de Rodbard. Conseqüentemente, o sistema é reproduzivelmente mais sensível, como pode ser observado na tabela XXIV.

Uma comparação entre os ensaios 1-4 e os demais mostra claramente a importância de manter-se níveis baixos e reproduzíveis de ligações inespecíficas, juntamente com a manutenção da inclinação inicial da curva, para que os valores de sensibilidade analítica permaneçam praticamente constantes, mesmo com a utilização de um traçador de até 60 dias de idade. A este respeito é importante ressaltar que os primeiros 4 ensaios foram realizados com o mesmo traçador respectivamente com as seguintes idades: 11, 24, 31 e 60 dias.

Outro dado importante mostrado pela Fig. 13 é o maior intervalo de trabalho obtido com a curva otimizada, principalmente com relação às doses baixas de hTSH. A consequência principal deste fato é que a sensibilidade funcional do sistema otimizado é pelo menos 5-6 vezes maior, com relação àquela apresentada pelo sistema não otimizado.

DISCUSSÃO

A existência de reagentes marcados que se ligam inespecificamente já foi mencionada para sistemas imunoradiométricos baseados na utilização de uma fase sólida como sistema de separação (34) e mais recentemente para o caso de traçadores não isotópicos (40). A natureza química desta forma alterada não foi descrita e, de acordo com os nossos dados, foi identificada uma forma de ^{125}I -mAB agregado, que foi parcialmente separada do pico principal de ^{125}I -mAB com a utilização de um sistema de purificação baseado em Sephadex G-200.

Na Fig. 1, podemos observar que a cinética da ligação específica resultou em curvas cujas inclinações são análogas, mesmo quando o produto é estocado em condições diferentes de temperatura ou estado físico. Este fato sugere tratar-se de um tipo de alteração relacionada com o fenômeno do decaimento radioativo, como foi mostrado para outros tipos de traçadores (4). No caso da cinética da ligação inespecífica, uma inclinação análoga e de sinal contrário foi obtida para o produto estocado em forma congelada ou liofilizado, surpreendentemente não mostrando nenhuma correlação com o tempo quando o produto foi estocado a 4°C .

O mesmo tipo de experimento realizado para verificar uma possível influência da BSA sobre a formação do agregado de ^{125}I -mAB, forneceu indicações de que a presença de BSA não influi na formação deste componente indesejável, tanto quanto a temperatura de estocagem. A BSA mostrou-se determinante somente com relação à proteção do traçador estocado na forma congelada, confirmando resultados obtidos anteriormente (4). A estocagem a 4°C , com ou sem BSA, seria ao nosso ver determinante no sentido de permitir uma maior mobilidade molecular em solução, impedindo a agregação ou facilitando a desiodação do componente indesejado. Nesta situação, a BSA teria função de carregador de ^{125}I ou de fragmentos marcados, reduzindo assim a

porcentagem de ^{125}I livre, como mostram as tabelas VII e VIII. Conseqüência deste estudo, além dos resultados mencionados sobre uma possível identificação físico-química das ligações inespecíficas, foi a comprovação de que a melhor condição de estocagem é a 4°C . Hunter e col. (34) declararam uma maior retenção de atividade imunológica para um mAB radioiodado anti-alfafetoproteína, quando o mesmo foi mantido a 4°C em comparação com o traçador estocado a -20°C , -80°C ou liofilizado. Contrariamente aos resultados apresentados por estes autores, em nossas condições, a -20°C não há perda de atividade imunológica do traçador, mas sim um claro incremento das ligações inespecíficas.

Identificada a possível origem e natureza química da ligação inespecífica e prosseguindo com o estudo de métodos que pudessem diminuir e controlar este fenômeno, foram encontradas maneiras bastante efetivas e práticas para este propósito, sendo que algumas, como a repurificação do traçador, são comumente utilizadas para que o mesmo possa ser empregado por um período maior de tempo. A este respeito os dois tipos de repurificação, utilizados por nós, tiveram mais uma função coadjuvante. A prática e rápida repurificação na Sephadex G-25 ajudou somente na eliminação do ^{125}I livre, sem influenciar a ligação inespecífica. A mais trabalhosa repurificação na Sephadex G-200 de alta resolução foi utilizada somente para traçadores mais antigos, melhorando as ligações específicas e inespecíficas, mas não sendo suficiente para alcançar os níveis de B_0 por nós julgados necessários.

O processo de "limpeza" do traçador mostrou ser de grande utilidade, pois observou-se uma diminuição apenas do B_0 e manutenção do B_{50} , o que acarreta uma melhora significativa da razão sinal/ruído. Sua utilização também resultou ser prática, rápida, de custo acessível e de aplicação universal.

A adição de soro também foi otimizada no sentido deste componente ser sempre empregado, mesmo em concentração limitada, na curva dose-resposta. A presença de uma matriz sérica está relacionada com a minimização dos efeitos inespecíficos ou de matriz, que causam diferenças intrínsecas entre as respostas correspondentes às doses da preparação de referência e às obtidas para as amostras desconhecidas (23, 42, 46).

A utilização de soros de origens diferentes, como eqüina, humana, bovina ou porcina, é relatada em alguns sistemas comerciais (7, 25, 31, 47, 56, 58), também podendo ser realizada a diluição dos padrões nas mesmas matrizes séricas (46, 51, 70, 71, 83). Porém, em outros esquemas não é mencionada a adição de soro (30, 35, 43, 53, 61), principalmente em protocolos de ensaios de hTSH em papel de filtro para determinar hipotireoidismo congênito (3, 15, 78, 79). Nestes últimos, pode-se considerar que o soro está praticamente ausente, como por exemplo no caso de utilizar-se um disco de papel de filtro de 3mm de diâmetro, o que corresponde a aproximadamente 2,9 μ l de sangue (3).

A utilização deste recurso demonstrou-se extremamente eficiente e só não pôde ser empregado mais amplamente e em maior concentração por ter-se observado, às vezes, uma enorme queda nas ligações específicas, nem sempre reprodutível. Além disto, a utilização de diferentes tipos de partículas magnéticas, mostrou-nos que esta variação está também relacionada com o tipo de fase sólida e pode levar a uma redução ainda maior das ligações, com completa inutilização do sistema.

A saturação da fase sólida com proteínas do leite foi outro recurso utilizado para diminuir o B_0 e resultou numa significativa melhora da qualidade do reagente magnético. Este tipo de saturação foi também empregado em sistemas imunoquímio-luminescentes em placas recobertas com avidina, para a mesma finalidade (11), sendo que a adição de uma etapa de saturação da fase sólida

com soro possibilitou a introdução da quarta geração de ensaios para o hTSH (71).

Os resultados obtidos no acoplamento saturando com proteínas do leite forneceram outro instrumento valiosíssimo, de baixo custo e de simples aplicação: a eficiência de saturação muito superior àquela apresentada pela BSA indica possibilidades de aplicação também em outros sistemas.

O estudo sobre a identificação e a minimização da ligação inespecífica, relacionado com a maneira de estocar o traçador e com todas as otimizações do sistema para diminuir a influência negativa deste componente indesejável sobre a sensibilidade do ensaio, demonstrou que o mesmo pode ser diminuído e controlado, com conseqüente melhora no desempenho do IRMA magnético (19, 47, 61). No presente trabalho, foram obtidos níveis reprodutíveis de ligações inespecíficas, que podem ser mantidos sempre $<0,1\%$ ($<70\text{cpm}$), um resultado somente descrito na literatura para um sistema magnético imunoquimioluminescente da Ciba-Corning (12, 13), aumentando assim a razão sinal-ruído para valores acima de 300-500. Ao nosso ver, foi somente com valores de ligação inespecífica deste nível que foi possível alcançar a mesma sensibilidade para o hTSH de $0,02\text{mUI/L}$ mencionada anteriormente para o IRMA magnético também da Corning.

O resultado que melhor comprova a qualidade do nosso sistema otimizado é sua sensibilidade funcional de aproximadamente $0,05\text{ mUI/L}$ de hTSH, para um CV inter-ensaio de 20%, um valor que é somente 2-3 vezes mais alto que o valor obtido para a sensibilidade analítica (da ordem de $0,02\text{mUI/L}$). Estes resultados classificam o nosso sistema como provavelmente o mais sensível IRMA magnético já descrito na literatura (17, 18, 25, 26, 44, 48, 56, 58, 76, 82).

A sensibilidade analítica é o método mais comumente utilizado para o

cálculo da sensibilidade de um ensaio, apesar de existirem orientações que recomendam o uso da sensibilidade funcional (9, 29, 50, 57, 63, 70, 74, 80). O cálculo baseado em apenas multireplicatas da dose zero (sensibilidade analítica) não considera os erros ocorridos com simples duplicatas intra-ensaio, resultando numa estimativa otimistica do desempenho de um ensaio de hTSH (48). Porém, ao nosso ver, este método pode servir perfeitamente na prática da comparação entre vários sistemas de ensaio, especialmente para laboratórios que não realizam uma rotina de determinações, as quais facilitam a construção de perfis de imprecisão.

Quanto à sensibilidade calculada especificamente pelo método de Rodbard, foram obtidos valores mais otimistas, ao redor de 0,008 mUI/L de hTSH, porém uma comparação com outros sistemas comerciais que utilizam este método de cálculo (35, 58), mostra também uma sensibilidade superior do nosso esquema de ensaio.

Os valores analíticos por nós obtidos, além de estarem localizados no limite máximo da segunda geração, servem também para indicar uma reprodutibilidade muito alta para este tipo de avaliação inter-ensaio, com um coeficiente de variação da ordem de 20-25%.

Em conclusão, lembramos que o desempenho do sistema IRMA proposto, o qual baseia-se num esquema de ensaio não competitivo, é especialmente condicionado pela atividade específica do traçador (22) que, como já mencionado, é bem menor (cerca de 10^6 vezes) para o ^{125}I que para um composto não isotópico como o európio. Contudo, apesar deste tipo de limitação inerente utilização de um radioisótopo, foi obtido um IRMA magnético com um desempenho da mesma ordem daquele declarado por alguns autores com relação a sistemas notoriamente de terceira geração. Com relação à sensibilidade funcional, o nosso sistema também apresentou valores similares a de alguns ensaios de terceira geração (70, 74, 80), considerando $CV = 10$ ou

20%, como foram calculados por estes autores.

Ficou demonstrado portanto que um rígido controle sobre as ligações inespecíficas pode aumentar enormemente a sensibilidade de um esquema de ensaio baseado em radioisótopo e separação magnética, permitindo uma reprodutibilidade de desempenho que pode acompanhar o traçador ao longo de toda sua vida útil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AL-ABDULLA, I.H.; MELLOR, G.W.; CHILDSTONE, M.S.; SIDKI, A.M.; SMITH, D.S. Comparison of three different activation methods for coupling to magnetisable cellulose particles. *J. Immunol. Methods.*, 122:253-8, 1989.
2. ALLEN, K.R. & DEREK, W. Thyrotropin as the initial screening test for thyroid disease. *Clin. Chem.*, 30:502-3, 1984.
3. ARENDS, J. & NORGAARD-PEDERSEN, B. Immunofluorimetry of thyrotropin, from whole-blood spots on filter paper, to screen for congenital hypothyroidism. *Clin. Chem.*, 32:1854-6, 1986.
4. BARTOLINI, P.; ASSIS, L.M.; FONSECA, M.L.Q. Radioiodination of human growth hormone with characterization and minimization of the commonly defined "damaged products". *Clin. Chim. Acta*, 110: 177-85, 1981.
5. BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P.; CAMILLO, M.A. Improvement of reproductibility and quality control of human growth hormone radioiodination. *Rev. Hosp. Fac. Med. S. Paulo*, 42: 93-100, 1988.
6. BASSET, F.; EASTMAN, C.J.; MA, G.; MABERLY, G.F.; SMITH, H.C. Diagnostic value of thyrotropin in serum as measured by a sensitive immunoradiometric assay. *Clin. Chem.*, 32:461-4, 1986.

***DE ACORDO COM**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas : NB-66. In.-. Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. p13-20
SERIAL sources for BIOSIS data base. Philadelphia, BIOSIS, 1990

7. BAYER, M.F.; KRISS, J.P.; McDOUGALL, R. Clinical experience with sensitive thyrotropin concentrations measurements: diagnostic and therapeutic implications. *J. Nucl. Med.*, 26:1248-56, 1985.
8. BAYER, M.F.; MACOVIK, J.A.; McDOUGALL, R. Diagnostic performance of sensitive measurements of serum thyrotropin during severe nonthyroidal illness: their role in diagnosis of hyperthyroidism. *Clin. Chem.*, 33:2178-84, 1987.
9. BAYER, M.F. Performance criteria for appropriate characterization of "(highly) sensitive" thyrotropin assays. *Clin. Chem.*, 33:530-1, 1987.
10. BIGOS, S.T.; PEKARY, A.E.; MacLEAN, J.; PIERCE, C.E.; REED, A.W.; JEROME, M.H. A thyrotropin radioimmunoassay kit evaluated vs two reference assays. *Clin. Chem.*, 30:437-9, 1984.
11. BODMER, D.M. & TIEFENAUER, L.X. Treatment of antibodies to reduce non-specific binding in immunoassays using the avidin-biotin complex. *J. Immunoassay*, 11:139-45, 1990.
12. BOLAND, J.; KRODEL, E.; KWATKOWSKI, M. The CIBA Corning ACS:180™ benchtop immunoassay analyser. *Clin. Chem.*, 36:1598-602, 1990.
13. BRUGUÉS, J.M.; ROCHE, N.G.; ESPINOSA, J.R.; RIUS, M.C.; SASTRE, F.G. Evaluation of CIBA Corning ACS:180™ automated immunoassay system. *Clin. Chem.*, 40:407-10, 1994.

14. CALDWELL, G.; GOW, S.M.; SWEETING, V.M.; BECKETT, G.J.; SETH, J.; TOFT, A.D. Value and limitations of a highly sensitive immunoradiometric assay for thyrotropin in the study of thyrotroph function. *Clin. Chem.*, 33:303-5, 1987.
15. CAMARGO NETO, E. Neonatal hypothyroidism screening with immunochemiluminometric assay of thyrotropin. *Clin. Chem.*, 37:1796, 1991.
16. CHAPMAN, R.S. & 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*, 118: 129-34, 1982.
17. COBB, W.E.; LAMBERTON, R.P.; JACKSON, M.D. Use of a rapid, sensitive immunoradiometric assay for thyrotropin to distinguish normal from hyperthyroid subjects. *Clin. Chem.*, 30:1558-60, 1984.
18. DUBUIS, J.M. Thyroid-stimulating hormone measurements by immunoradiometric assay in severely ill patients. *Lancet*, 1:1036-7, 1986.
19. EDWARDS, R.; HOPE, H.J.; SUPRAROP, P. Preparation of magnetizable solid-phase antibodies and use in bulk matched reagent assay; comparison of results with established methods. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY ed. "Developments in Radioimmunoassay and Related Procedures" IAEA, Vienna, 1992. p.177-85.
20. EDWARDS, R. Immunoradiometric assay - In: *Immunoassay - An Introduction*. William Heinemann Medical Books, London, 1985. p.40-54.

21. EGGERTSEN, R.; PETERSEN, K.; LUNDBERG, P.A.; NYSTRÖM, E.; LINDSTEDT, G. Screening for thyroid disease in a primary care unit with a thyroid stimulating hormone assay with a low detection limit. *Br. Med. J.*, 297:1586-92, 1988.
22. EKINS, R.P. & CHU, F.W. Multianalite microspot immunoassay - microanalytical "compact disk" of the future. *Chin. Chem.*, 37:1955-67, 1991.
23. EKINS, R.P. Future developments in radioimmunoassay with particular reference to the needs of developing countries. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY ed. "Developments in Radioimmunoassay and Related Procedures" IAEA, Viena, 1992. p. 3-51.
24. ENDO, Y.; MIYAI, K.; IJIMA, Y.; NAKAJIMA, T.; EDA, Y.; FUJITA, H.; UNOKI, M. Epitope mapping of human thyrotropin. *Acta Endocrinologica*, 120:201-9, 1989.
25. ESPINOSA, J.R.; BURGUES, J.M.; LLANOS, J.O.; RUIS, M.C.; COMPANYO, J.M.Q.; SASTRE, F.G. Technical and clinical performance of six sensitive immunoradiometric assays of thyrotropin in serum. *Clin. Chem.* 33:1439-45, 1987.
26. EVANS, M.C. Ten commercial kits compared for assay of thyrotropin in the normal and thyrotoxic range. *Clin. Chem.*, 34:123-7, 1988.
27. FORREST, G.C. & RATTLE, S.J. Magnetic particle radioimmunoassay. In: *Immunoassays of Clinical Chemistry*, Eds. W. M. Hunter, J. E. T. Corrie. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983. p.147-61.

28. GREENWOOD, C. & HUNTER, W.M. The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radiativity. *Biochem. J.*, **89**: 114-23, 1963.
29. HAY, I.D.; BAYER, M.F.; KAPLAN, M.M.; KLEE, G.G.; LARSEN, P.R.; SPENCER, C.A. American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. *Chin. Chem.*, **37**:2002-8, 1991.
30. HEMMILÄ, I.; DAKUBU, S.; MUKKALA, V.; SIITARI, H.; LÖVGREN, T. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Anal. Biochem.*, **137**:335-43, 1984.
31. HEYNINGEN, V. v.; ABBOTT, S.R.; DANIEL, S.G.; ARDISSON, L. J.; RIDGWAY, E.C. Development and utility of a monoclonal-antibody-based, highly sensitive immunoradiometric assay of thyrotropin. *Clin. Chem.*, **33**:1387-90, 1987.
32. HO, C.C. & CH'NG, S.L. Effect of serum, solvent, and detergent on antibody immobilized on polymeric substrates and its influence on antigen-antibody interaction. *J. Colloid Interface Sci.*, **121**:564-70, 1987.
33. HOPTON, M.R. & HARROP, J.S. Immunoradiometric assay of thyrotropin as a "first-line" thyroid-function in the routine laboratory. *Clin. Chem.*, **32**:691-3, 1986.
34. HUNTER, W.M.; BENNIE, J.G.; BROCK, D.J.H.; HEYNINGEN, V.v. Monoclonal antibodies for use in an immunoradiometric assay for α -foetoprotein. *J. Immunol. Methods*, **50**:133-44, 1982.

35. KAIHOLA, H.L.; IRJALA, K. VIKARI, J.; NÄNTÖ, V. Determination of thyrotropin in serum by time-resolved fluoroimmunoassay evaluated. *Clin. Chem.*, 31:1706-9, 1985.
36. KLEE, G.G. & HAY, I.D. Assessment of sensitive thyrotropin assays for an expanded role in thyroid function testing: proposed criteria for analytic performance and clinical utility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 64:461-471, 1987.
37. KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting specific antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-7, 1975.
38. KREUTZER, H.J.H.; TERTOOLEN, J.F.W.; THIJSEN, J.H.H.; KINDEREN, P.J.; KOPPESSCHAAR, H.P.F. Analytical evaluation of four sensitive assays of thyrotropin, including effects of variations in patients sampling. *Clin. Chem.*, 32:2085-90, 1986.
39. KRICKA, L.J. Selected strategies for improving sensitivity and reability of immunoassays. *Clin. Chem.*, 40:347-57, 1994.
40. KRICKA, L.J. Ultrasensitive immunoassay techniques. *Clin. Biochem.*, 26: 325-31, 1993.
41. LAWSON, N.; MIKE, N.; WILSON, R.; PANDOV, H. Assessment of a time-resolved fluoroimmunoassay for thyrotropin in routine clinical practice. *Clin. Chem.*, 32:684-6, 1986.

42. LIBEER, J.C.; SIMONET, L.; GILLET, R. Analytical evaluation of twenty assays for determination of thyrotropin (TSH). *Ann. Biol. Clin.*, 47:1-11, 1989.
43. LÖVGREN, T.; HEMMILÄ, I.; PETTERSSON, K.; ESKOLA, J.U.; BERTOFT, E. Determination of hormones by time-resolved fluoroimmunoassay. *Talanta*, 31:909-16, 1984.
44. MALTER, J.S.; MANOTTI, S.E.; KNEE, G.R.; GOODMAN, D.P.B.; STRAUSS, J. Identification of hyperthyroid patients by means of a sensitive assay for thyrotropin. *Clin. Chem.*, 31:642-44, 1985.
45. MARTINO, E.; BAMBINI, G.; BARTALENA, L.; MAMMOLI, C.; LOMBARDI, F.A.; BASCHIERI, L.; PINCHERA, A. Human serum thyrotropin measurement by ultrasensitive immunoradiometric assay as a first-line test in the evaluation of thyroid function. *Clin. Endocrinol.*, 24:141-8, 1986.
46. McBRIDE, J.H.; THIBEAULT, R.V.; RODGERSON, D.O. Thyrotropin as measured by a sensitive immunoradiometric assay. *Clin. Chem.*, 31:1865-7, 1985.
47. McCONWAY, M.G.; BIGGART, E.M.; CHAPMAN, R.S. Performance of the two-site immunoradiometric assay for serum thyroid stimulating hormone. Effects of changes in solid-phase matrix and antibody coupling chemistry. *J. Immunol. Methods.*, 104:87-92, 1987.

48. McCONWAY, M.G.; CHAPMAN, R.S.; BEASTALL, G.H.; BROWN, E.; TILLMAN, J.; BONAR, J.A.; HUTCHISON, A.; ALLISON, T.; FINLAYSON, J.; WESTON, R.; BECKETT, G.J.; CARTER, G.D.; CARLYLE, E.; HERBERTSON, R.; BLUNDELL, G.; EDWARDS, W.; GLEN, A.C.A.; REID, A. How sensitive are immunometric assays for thyrotropin? *Clin. Chem.*, 35:289-91, 1989.
49. MILES, L.E.M. & HALES, C.N. Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature*, 219:186-9, 1968.
50. NICOLOFF, J.T. & SPENCER, C.A. The use and misuse of the sensitive thyrotropin assays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71:553-8, 1990.
51. PAPANASTASIOU-DIAMANDI, A.; CHRISTOPOULOS, T.K.; DIAMANDIS, E.P. Ultrasensitive thyrotropin immunoassay based on enzymatically amplified time-resolved fluorescence with a terbium chelate. *Clin. Chem.*, 38:545-8, 1992.
52. PARNHAM, A.J. & TARBIT, I.F. "Delfia" and "Amerlite": two sensitive nonisotopic immunoassay systems for assay of thyrotropin compared. *Clin. Chem.*, 33:1421-4, 1987.
53. PATERSON, N.; BIGGART, E.M.; CHAPMAN, R.S.; BEASTALL, G.H. Evaluation of a time-resolved immunofluorimetric assay for serum thyroid stimulating hormone. *Ann. Clin. Biochem.*, 22:606-11, 1985.
54. PEKARY, A.E. & HERSHMAN, J.M. A new monoclonal-antibody two-site solid-phase immunoradiometric assay for human thyrotropin evaluated. *Clin. Chem.*, 30:1213-5, 1984.

55. **PETTERSSON, K. Comparison of immunoassays technologies. *Clin. Chem.*, 39:1359-60, 1993**
56. **PIKETTY, M.L.; TALBOT, J.N.; ASKIENAZY, S.; MILLHAUD, G. Clinical significance of a low concentration of thyrotropin: five immunometric "kit" assays compared. *Clin. Chem.*, 33:1237-41, 1987.**
57. **PILO, A.; ZUCHELLI, G.C.; MALVANO, R.; CLERICO, A.; IERVASI, G; SIGNORINI, C. Interassay variability of immunometric methods for thyrotropin in an external quality assessment survey: evidence that functional sensitivity is not always adequate for clinical decisions. *Clin. Chem.*, 38:1345-9, 1992.**
58. **RATTLE, S.J.; PURNELL, D.R.; WILLIAMS, P.I.M.; SIDDLE, K.; FORREST, G.C. New separation method for monoclonal immunoradiometric assays and its application to assays for thyrotropin and human choriogonadotropin. *Clin. Chem.*, 30:1457-61, 1984.**
59. **REICHSTEIN, E.; MORTON, R.C.; DIAMANDIS, E.P. Sensitive time-resolved immunofluorimetric assay of thyrotropin in serum. *Clin. Biochem.*, 22:23-9, 1989.**
60. **RIBELA, M.T.C.P.; SCHWARZ, I.; BARTOLINI, P. Setting up a Latin American reference preparation of human thyrotropin and its validation through an international inter-laboratory study. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY ed. "Developments in Radioimmunoassay and Related Procedures" IAEA, Viena, 1992. p.213-7.**

61. RIBELA, M.T.C.P.; SCHWARZ, I.; MORGANTI, L.E.; ARAÚJO, E.A.; SOARES, C.R.J.; ARKATEN, R.R.; BARTOLINI, P. In-house reagent preparation for the setting up of a magnetic immunoradiometric assay (IRMA) for hTSH. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY ed. "Developments in Radioimmunoassay and Related Procedures" IAEA, Viena, 1992. p.225-33.
62. RODBARD, D. Statistical estimation of the minimal detectable concentration ("sensitivity") for radioligand assays. *Anal. Biochem.*, 90: 1-12, 1978.
63. RODEN, M.; NOWOTNY, P.; HOLLENSTEIN, U.; SCHNEIDER, B.; VIERHAPPER, H.; WALDHÄUSL, W. Equivalent discrimination among states of thyroid function by immunochemiluminimetric and immunoradiometric determination of thyrotropin. *Clin. Chem.*, 39:544-7, 1993.
64. ROSENFELD, L. Immunoradiometric (IRMA) assay for thyrotropin (TSH) should replace the RIA method in the clinical laboratory. *Clin. Chem.*, 32:232-3, 1986.
65. ROSS, D.S.; DANIELS, G.H.; GOUVEIA, D. The use and limitations of a chemiluminescent thyrotropin assay as a single thyroid function test in an out-patient endocrine clinic. *J. Clin.Endocrinol. Metab.*, 71: 764-9, 1990.
66. ROSS, D.S. New sensitive immunoradiometric assays for thyrotropin. *Ann. Int. Med.*, 104:718-20, 1986.

67. SETH, J.; KELLETT, H.A.; CALDWELL, G.; SWEETING, V.M.; BECKETT, G.J.; GOW, S.M.; TOFT, A.D. A sensitive immunoradiometric assay for serum thyroid stimulating hormone: a replacement for the thyrotropin hormone test? *Br. Med. J.*, 289: 1334-6, 1984.
68. SPENCER, C.; ELGEN, A.; SHEN, D.; DUDA, M.; QUALLS, S.; WELLS, S.; NICOLOFF, J. Specificity of sensitive assays of thyrotropin (TSH) used to screen for thyroid disease in hospitalized patients. *Clin. Chem.*, 33:1391-6, 1987.
69. SPENCER, C.A.; ROSENFELD, A.O.; GUTTLER, R.B.; LoPRESTI, J.S.; MARCUS, D.; NIMALASURIYA, A.; EIGEN, A.; DOSS, R.C.; GREEN, B.J.; NICOLOFF, J.T. Thyrotropin secretion in thyrotoxic and thyroxine-treated patients: assessment by a sensitive immunoenzymometric assay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63:349-55, 1986.
70. SPENCER, C.A.; LoPRESTI, J.S.; PATEL, A.; GUTTLER, R.B.; EIGEN, A.; SHEN, D.; GRAY, D.; NICOLOFF, J.T. Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70:453-60, 1990.
71. SPENCER, C.A.; SCHWARZBEIN, D.; GUTTLER, R.B.; LoPRESTI, J.S.; NICOLOFF, J.T. Thyrotropin (TSH)-releasing hormone stimulation test responses employing third and fourth generation TSH assays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76:494-8, 1993.
72. SOINI, E. & KOJOLA, H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates - a new generation of nonisotopic immunoassays. *Clin. Chem.*, 29:65-8, 1983.

73. SOINI, E. & LÖVGREN, T. Time-resolved fluorescence of lanthanide probes and applications in biotechnology. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **18**:105-54, 1987.
74. TAIMELA, E.; AALTO, M.; KOSKINEM, P.; IRJALA, K. Clinical and laboratory studies of time-resolved fluorescence immunoassays of thyrotropin and free triiodothyronine. *Clin. Chem.*, **39**:679-82, 1993.
75. TAIMELA, E.; TÄHTELÄ, R.; KOSKINEM, P.; NUUTILA, P.; FORSSSTRÖM, J.; TAIMELA, S.; KARONEN, S.; VÄLIMÄKI, M.; IRJALA, K. Ability of two new thyrotropin (TSH) assays to separate hyperthyroid patients from euthyroid patients with low TSH. *Clin. Chem.*, **40**:101-5, 1994.
76. THONNART, B.; MESSIAN, O.; LINHART, N.C.; BOK, B. Ten highly sensitive thyrotropin assays compared by receiver-operating characteristic curves analysis: results of a prospective multicenter study. *Clin. Chem.*, **34**:691-5, 1988.
77. THORNER, M.O.; VANCE, M.L.; HORVATH, E.; KOVACS, K. The anterior pituitary. - In: *Williams Textbook of Endocrinology*, Ed. J. W. Wilson, D. W. Foster. Philadelphia, USA, W. B. Saunders, 1992. p.221-310.
78. TUUMINEN, T.; KÄPYAHO, K.I.; RAKKOLAINEN, A.E.M.; BUGROVA, V.B.; TSUKERMAN, G.L.; JESSE, E.; SANDER, J. New neonatal thyrotropin enzyme immunoassay with fluorimetric detection: comparison with time-resolved fluoroimmunoassay. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **31**: 49-53, 1993.

79. WAITE, K.V.; MABERLY, G.F.; MA, G.; EASTMAN, C.J. Immunoradiometric assay with use of magnetizable particles: measurement of thyrotropin in blood spots, to screen for neonatal hypothyroidism. *Clin. Chem.*, 32:1966-8, 1986.
80. WILKINSON, E.; RAE, P.W.H.; THOMSON, K.J.T.; TOFT, A.D.; SPENCER, C.A.; BECKETT, G.J. Chemiluminescent third generation assay (Amerlite TSH-30) of thyroid-stimulating hormone in serum or plasma assessed. *Clin.Chem.*, 39:2166-73, 1993.
81. WONDISFORD, F.E.; USALA, S.J.; DeCHERNEY, G.S.; CASTREN, M.; RADOVICK, S.; GYVES, P.W.; TREMPER, J.P.; KERFOOT, B.P.; NICODEM, V.M.; CARTER, B.J.; WEINTRAUB, B.D. Cloning of the human thyrotropin β -subunit gene and transient expression of biologically active human thyrotropin after gene transfection. *Mol. Endocrinol.*, 2:32-9, 1988
82. WOODHEAD, J.S. & WEEKS, I. Circulating thyrotropin as an index of thyroid function. *Ann. Clin. Biochem.*, 22:455-9, 1985.
83. ZAHEER, F. Behaviour of iodine-125 labelled monoclonal anti-TSH and cellulose linked (solid-phase) antibodies in a supersensitive TSH IRMA. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY ed. "Developments in Radioimmunoassay and Related Procedures" IAEA, Viena, 1992. p.73-81.