

R 616  
R 433 P  
2006  
0x1  
UR

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DO SUL DE MINAS – UNIS/MG**

**BIOMEDICINA**

**MARCOS ROBERTO RESENDE  
PRISCILLA SILVEIRA DE MELO BERNARDES**

*Biomedicina*

**PRODUÇÃO DE ANTISSORO HIPERIMUNE ANTI – ALFA-1-  
GLICOPROTEÍNA ÁCIDA PARA USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO  
PELA TÉCNICA DE TURBIDIMETRIA**

**Varginha  
2006**

**MARCOS ROBERTO RESENDE  
PRISCILLA SILVEIRA DE MELO BERNARDES**

**PRODUÇÃO DE ANTÍSSORO HIPERIMUNE ANTI – ALFA-1-  
GLICOPROTEÍNA ÁCIDA PARA USO EM DIAGNOSTICO IN VITRO  
PELA TÉCNICA DE TURBIDIMETRIA**

Monografia apresentada ao curso de Biomedicina do Centro Universitário do Sul de Minas – UNIS/MG, como pré-requisito para obtenção do grau de bacharel, sob Orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Agda Andrade.

**Varginha  
2006**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**  
**MARCOS ROBERTO RESENDE**  
**PRISCILLA SILVEIRA DE MELO BERNARDES**

**PRODUÇÃO DE ANTISSORO HIPERIMUNE ANTI – ALFA-1-  
GLICOPROTEÍNA ÁCIDA PARA USO EM DIAGNOSTICO IN VITRO  
PELA TÉCNICA DE TURBIDIMETRIA**

Monografia apresentada ao curso de Biomedicina do Centro Universitário do Sul de Minas – UNIS/MG, como pré-requisito para obtenção do grau de bacharel pela Banca Examinadora composta pelos membros:

Aprovado      A  B  C

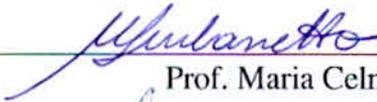
Reprovado

Data    /    /

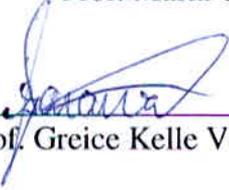
---

Dr.<sup>a</sup> Agda Andrade.

---

  
Prof. Maria Celma

---

  
Prof. Greice Kelle Viegas Saraiva

OBS.:

Dedico este trabalho a todos aqueles que  
contribuíram para sua realização.

Agradeço aos meus colegas, professores e a minha família por terem ajudado na construção deste trabalho.

"Nada neste mundo é tão poderoso como  
uma idéia cuja oportunidade chegou".

Victor Hugo

## RESUMO

RESENDE, Marcos Roberto; BERNARDES, Priscilla Silveira de Melo. **Produção de antissoro hiperimune anti – alfa-1-glicoproteína ácida para uso em diagnostico in vitro pela técnica de turbidimetria.** 2006. 33 f .Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Centro Universitário do Sul de Minas – UNIS \ MG, Varginha, 2006.

A determinação da alfa -1- Glicoproteína ácida é útil no diagnóstico e acompanhamento de patologias em estado de fase aguda e processos inflamatórios. Porém a produção do reagente só pode ser realizada mediante a importação da matéria-prima “anticorpo anti alfa-1-glicoproteína ácida”, fato este que aumenta o custo e dificulta a produção. O presente trabalho tem como objetivo a produção e purificação de anticorpo anti alfa-1-glicoproteína ácida, através da imunização em coelhos. Apresenta-se como estudo experimental hipotético dedutivo realizado na BioTécnica Indústria de produção e desenvolvimento de kits para laboratório e no Centro Universitário do Sul de Minas em Varginha (MG). Foram utilizados na pesquisa coelhos albinos, jovens, machos, as raça Nova Zelândia com peso variante de 2 a 2,5 Kg. Foram estudadas variáveis como a resposta imunológica dos coelhos, a quantidade da reação imunológica e a qualidade do antissoro. Analisando os resultados obtidos nos experimentos, conclui-se que é possível a produção do reagente para a detecção de alfa – 1-glicoproteína ácida, através da imunização dos coelhos desde que sejam realizados testes de padronização do reagente de trabalho para turbidimetria, tais como, linearidade, ponto final, exatidão e formulação do tampão diluente.

**Palavras-chave:** Alfa-1-glicoproteína ácida. Marcador inflamatório. Fase aguda. Turbidimetria. Imunização.

## ABSTRACT

RESENDE, Marcos Roberto; BERNARDES, Priscilla Silveira de Melo. Produção de antissoro hiperimune anti - alfa-1-glicoproteína ácida para uso em diagnostico in vitro pela técnica de turbidimetria. 2006. 33 f .Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Centro Universitário do Sul de Minas – UNIS \ MG, Varginha, 2006.

The determination of alpha -1 - acid Glycoprotein is useful in the diagnosis and inflammatory accompaniment of patologias in state of acute phase and processes. However the production of the reacting one only can be carried through by means of the importation of the raw material “antibody anti acid alpha-1-glycoprotein”, fact this that increases the cost and makes it difficult the production. The present work has as objective the production and purificação of antibody anti acid alpha-1-glycoprotein, through the immunization in rabbits. It is presented as deductive hypothetical experimental study carried through in the Human engineering Industry of production and development of kits for laboratory and in the University Center of the South of Mines in Varginha (MG). Albinic, young, male rabbits had been used in the research, the New race Zelândia with variant weight of 2 the 2,5 Kg.Foram studied changeable as the imunológica reply of the rabbits, the amount of the imunológica reaction and the quality of antissoro. Analyzing the results gotten in the experiments, it is concluded that the production of the reagent for the alpha detention is possible - 1 - acid glycoprotein, through the immunization of the rabbits since that tests of standardization of the reagent of work for turbidimetria are carried through, such as, linearity, end point, exactness and formularization of the drain plug diluente.

**Keywords:** acid Alpha-1-glycoprotein. Inflammatory marker. Acute phase. Turbidimetria. Immunization.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Placa de imunodifusao I.....	18
Figura 2 - Placa de imunodifusao II.....	18
Figura 3 - Comportamento cinético I.....	19
Figura 4 - Comportamento cinético II.....	19
Figura 5 - Comportamento cinético III.....	19
Figura 6 - Comportamento cinético IV.....	19
Figura 7 - Comportamento cinético V.....	20
Figura 8 - Comportamento cinético VI.....	20
Figura 9 - Comportamento cinético VII.....	20
Figura 10 - Comportamento cinético VIII.....	20
Figura 11 - Comportamento cinético IX.....	21
Figura 12 - Comportamento cinético X.....	21
Figura 13 - Linearidade do anti-soro 1.....	22
Figura 14 - Linearidade do anti-soro 2.....	22

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Resultados de linearidade do antissor 1, referentes ao gráfico 6A .....	21
Tabela 2 - Resultados de linearidade do antissor 2 referentes ao gráfico 6B.....	21
Tabela 3 - Teste de exatidão do antissor 1 .....	22
Tabela 4 - Teste de exatidão antissor 2 .....	23

## SUMÁRIO

### INTRODUÇÃO

1 Alfa -I- glicoproteína ácida.....	12
2 Materiais e Métodos .....	15
2.1 Fase A – Aclimatação .....	15
2.2 Fase B - Seqüências das imunizações .....	15
2.2.1 Procedimento das imunizações .....	15
2.3 Fase C - Seqüência das Sangrias .....	16
2.4 Fase D - Avaliação da resposta imunológica dos coelhos .....	16
2.4.1 Comportamento cinético.....	16
2.4.2 Exatidão.....	17
2.4.3 Linearidade.....	17
2.5 Fase E - Purificação o antissoro. ....	17
2.6 Fase F - Avaliação da especificidade do antissoro. ....	17
3 Resultados .....	19
3.1 Comportamento cinético .....	19
3.2 Linearidade .....	21
3.3 Teste de exatidão.....	22
4 Imunodifusão dupla ou OUCHTERLONY.....	24
5 Conclusão .....	26
REFERENCIAS .....	27
Anexo A- Adjuvante de Freund.....	28
Anexo B – Diluições para teste de comportamento cinético.....	29
Anexo C – Procedimento da purificação .....	30
Anexo D – Comportamento Cinético.....	31

## INTRODUÇÃO

Este trabalho tem como objetivo a produção e purificação de anticorpo anti-alfa -1-glicoproteína ácida (AAGPA). Os anticorpos serão obtidos através da imunização em coelhos e o seu isolamento, a partir de soro hiperimune, será realizados através de precipitação química usando o sulfato de amônio.

Freqüentemente os imunologistas necessitam produzir e isolar anticorpos puros, que tanto podem ser monoclonais quanto policlonais visando à fabricação de kits para o diagnóstico "IN VITRO" de doenças infecciosas, inflamatórias, auto-imunes e das imunodeficiências. A escolha do tipo de antígeno a ser utilizado é um critério essencial para induzir a produção de altas concentrações de anticorpos, ter imunogenicidade suficiente para gerar respostas imunológicas altamente específicas. Além disso a escolha da via de administração do antígeno, a escolha do animal, bem como o tempo e o número de inoculações é importante para a produção de anticorpos.

Sabe-se que certas substâncias, adicionadas ou emulsificadas com um antígeno, potencializam sobremaneira a produção de anticorpos, ou seja estas substâncias atuam como adjuvantes. Com o entendimento moderno dos processos que levam à melhor resposta imunológica, esforços consideráveis têm sido feitos na produção de melhores adjuvantes, para as respostas imunológicas. Os adjuvantes têm função depósito, induzindo pequenos granulomas nos quais os antígenos são retidos e isso estimula enormemente a produção de anticorpos. Tais adjuvantes são compostos por partículas inertes que tem a finalidade de aumentar a resposta imunológica e reduzir o tempo de sua produção. Uma variedade de substâncias estranhas como lipossomos, blocos de polímeros, sais inorgânicos e etc... podem agir como adjuvantes.

O anticorpo AAGPA será utilizado na produção de reagentes para procedimento analítico imunoturbidimétrico para a quantificação de alfa -1-glicoproteína em laboratórios para diagnóstico "IN VITRO", já que a determinação da alfa 1 glicoproteína ácida é empregada clinicamente no monitoramento das doenças inflamatórias e infecciosas de fase aguda, no acompanhamento das flutuações da doença, bem como na avaliação das terapêuticas antiinflamatórias, na artrite reumatóide e nas neoplasias.

O presente trabalho foi realizado na BioTécnica, que é uma indústria de produção e desenvolvimento de kits de bioquímica e imunologia para o diagnóstico "IN VITRO". A execução da pesquisa proporcionou uma interação entre a universidade e a indústria.

As técnicas imunológicas são cada vez mais utilizadas pelos laboratórios de análises clínicas para análise “IN VITRO” de uma variedade de analitos, dentro delas destaca-se a técnica de turbidimetria. Atualmente, os laboratórios tem intensificado cada vez mais as análises em sistemas automatizados, diminuindo os custos dos testes e aumentando a rapidez e precisão dos resultados. A turbidimetria é uma técnica imunológica que atende esses requisitos por ser altamente específica, automatizável, de baixo custo operacional que quantifica com exatidão e rapidez a ligação antígeno-anticorpo. Infelizmente no mercado de diagnóstico “IN VITRO” no Brasil existe uma carência enorme de fabricantes de kits destinados a testes imunológicos turbidimétricos, os que existem são de fornecedores estrangeiros e de alto custo, além das taxas de importação, frete e remessa de divisas para fora do país.

Diante do exposto este projeto visou à produção de anticorpos AAGPA para a fabricação de kits de imunoturbidimetria que irá substituir a importação dos mesmos além de que será a fonte de subsídios científicos e tecnológicos para o desenvolvimento de outros produtos da linha de turbidimetria.

## 1 ALFA-1-GLICOPROTEÍNA ÁCIDA

A alfa -1-glicoproteína ácida (AGPA) é uma proteína de fase aguda e , como tal , tem a propriedade de aumentar a sua concentração plasmática em resposta ao estado inflamatório que ocorre em infecções, ferimentos, cirurgias, trauma, ou outras lesões teciduais. Conforme Downton (1988) a elevação dessa proteína indica um reforço nos mecanismos de defesa do organismo com a função de inibir ou neutralizar as enzimas lisossomais liberadas pelos leucócitos fagocitários durante a necrose tissular.

Para Gorina (1996) a AAGP aumenta durante as inflamações agudas e crônicas. Está elevada após o infarto do miocárdio, em doenças auto-imunes, nas neoplasias malignas, na obesidade, na artrite reumatóide, no uso dos glicocorticóides (endógenos e exógenos), durante os exercícios físicos e nas anormalidades hematológicas. A diminuição da AAGP é encontrada em doenças hepáticas crônicas, síndrome nefrótica, gravidez, administração de estrogênios, perdas protéicas gastrointestinais e na infância.

Burtis (1999) define que a AGPA é constituída de 181 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular de aproximadamente 41kDa a 43kDa. Cerca de 45% deste peso são devidos a carboidratos, com hexose, hexosamina e ácido siálico presentes em iguais proporções. Esta proteína, também conhecida como “orosomucóide”, é o componente quantitativamente mais importante da fração mucoproteína presente no soro sendo a porção carboidrato da molécula relacionada a processos de modulação do sistema imune.

A AGPA pertence à classe das glicoproteínas, segundo Ritchie (2000) mais de sessenta proteínas já foram identificadas e caracterizadas no plasma sanguíneo. Essas proteínas podem ser grosseiramente divididas em proteínas que não contêm carboidratos (albumina) e nem glicoproteínas. Henry (1995) afirma que as glicoproteínas são proteínas simples unidas a carboidratos, geralmente, polissacarídeos, ao que se deve a viscosidade das suas soluções; são proteínas formadoras de muco nos tecidos e nas secreções e, do ponto de vista estrutural, intervêm como componentes de ligamentos, tendões, cartilagens, etc. Sua característica estrutural a torna muito estável e muito solúvel passando pelo filtro glomerular em larga extensão, resultando em uma meia vida de apenas 5 dias na circulação. Ela é a maior proteína de fase aguda que é encontrada na manutenção da homeostase, fato este analisado por Chmid (1989).

A maior síntese de AGPA é no fígado; também pode ser sintetizada pelos leucócitos e por células tumorais. O nível de AGPA no sangue varia de acordo com o sexo e a idade. Chmid (1989) considera que a função fisiológica da alfa-1-glicoproteína ácida é

desconhecida, porém, sabe-se que a mesma pode ligar-se a hormônios como progesterona, a anestésicos, aos antibióticos, aos psicotrópicos, aos anti-coagulantes, aos anti-arrítmicos, entre outros.

O interesse essencial de dosar as proteínas de fase aguda é permitir registrar os surtos ou acessos inflamatórios, apreciar o fim do estado inflamatório e, nas inflamações crônicas, acompanhar as flutuações da doença, bem como avaliar a ação das terapêuticas antiinflamatórias segundo Borel (1987).

Picheth (2002) afirma que a quantificação sérica da AGPA é útil no diagnóstico e no acompanhamento dos processos agudos. Esta proteína também pode ser estimada pela quantificação da mucoproteína (Muco), ensaio que reflete as glicoproteínas com elevado teor de açúcar, entre as quais a AGPA é majoritária. A quantificação da AGPA utilizando anticorpos específicos está disponível para uso nos laboratórios clínicos há cerca de três décadas, e vários laboratórios introduziram este ensaio em suas rotinas em substituição à quantificação da Muco. Entre as vantagens dessa metodologia, podem ser citadas: especificidade, precisão e capacidade de automação do procedimento. Os reagentes comerciais disponibilizam calibradores e controles, possibilitando resultados confiáveis. A determinação da AAGP substitui com vantagens a dosagem de mucoproteínas por ser um teste mais específico, tecnicamente mais exato, podendo ser aplicado na rotina laboratorial, sendo necessário, entretanto, uma maior divulgação junto à classe médica.

Os procedimentos analíticos em maior uso para quantificação da AGPA são a turbidimetria e a nefelometria, automatizadas, realizadas na presença de anticorpos específicos. As excelentes reprodutibilidade e confiabilidade destes procedimentos os têm recomendado para substituir a determinação da mucoproteína. A quantificação da mucoproteína sérica pelo método de Winzler não é citada em publicações internacionais há mais de duas décadas, tendo sido substituída amplamente pela quantificação da AGPA em países de primeiro mundo como mostra Picheth (2002).

Segundo Ferreira (2001) para quantificar a AGPA "IN VITRO" utiliza-se o procedimento analítico turbidimétrico, uma técnica imunológica, baseada em testes analíticos que utilizam anticorpos e que se caracteriza por três importantes propriedades dos anticorpos:

- a) Habilidade de ligar-se a uma grande quantidade de moléculas químicas naturais ou sintéticas, biomoleculares, células e vírus. Isto porque os anticorpos são proteínas e seus sítios de ligação derivam de um alto número de combinação das seqüências de aminoácidos;

- b) Especificidade excepcional para substância que cada anticorpo liga;
- c) A força de ligação entre o anticorpo e seu alvo.

Como mostra Masson (1981) a turbidimetria baseia-se na medida de diminuição da luz transmitida ao atravessar uma amostra em que ocorreu a reação antígeno-anticorpo. É considerada hoje uma técnica altamente específica, determinando com exatidão o nível de ligação antígeno-anticorpo. Na determinação turbidimétrica da AGPA, o antissoro específico, presente no reagente do kit, contendo anticorpos anti-AGPA, forma com a AGPA presente na amostra do paciente, um complexo antígeno-anticorpo insolúvel dando uma turbidez cuja intensidade é proporcional à quantidade de antígeno (AGPA) determinado no espectrofotômetro. Os dados obtidos são comparados com padrões para se obter a concentração do analito presente na amostra.

Como mostra Englebienne (1996), desde 1960, as imunodosagens têm sido aplicadas, seu uso é muito difundido na área de bioquímica analítica.

Para assegurar a qualidade dos serviços em laboratório médicos é necessário implementar um sistema de qualidade que inclua um conjunto de processos. O uso de reagentes de qualidade nos processos industriais visa desenvolver produtos aceitáveis para sua finalidade pretendida.

A calibração é um processo de verificação e ajuste o sistema analítico. Onde Padrões ou calibradores protéticos são utilizados para designar um valor numérico à concentração presente em amostras com valores desconhecidos usando as leituras ou respostas analíticas encontradas.

De acordo com Westgard (1981) os materiais de controle de qualidade são usados na avaliação da confiabilidade de um processo analítico, particularmente a referente e a precisão e à exatidão e também como um meio de monitorar o desempenho analítico durante um determinado período.

A prevenção de erros implica no desenvolvimento de processos analíticos capazes de atingir os requerimentos da qualidade para a produção de resultados de utilidade médica. É uma atividade que determina a qualidade inerente dos processos de medida.

## 2 MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 Fase A – aclimatação

Antes de iniciados os experimentos os coelhos permaneceram em período de aclimatação de 10 dias na sala de experimentos do UNIS. Este período foi essencial para que estes animais se acostumassem à temperatura, a iluminação, a umidade, as gaiolas, e aos tratadores.

### 2.2 Fase B - seqüências das imunizações

Foram realizadas no total seis imunizações com intervalos de sete dias entre a primeira e a segunda imunização e com intervalos de três dias entre as demais. As imunizações foram realizadas na segunda e quinta feira de cada semana.

Foram utilizados 100 mg de alfa – 1 – glicoproteína ácida purificada (SIGMA). A primeira alíquota protéica foi ressuspendida em adjuvante completo de FREUND (Laborclin) e as demais em adjuvante incompleto de FREUND (Laborclin).

#### 2.2.1 Procedimento das imunizações

**1ª Imunização:** Foi inoculado 10 mg/dL de AGPA pura diluída em 0,5 mL de solução Salina (NaCl a 0,85 %) e misturada em 0,50 mL de adjuvante completo de Freund por meio de injeção subcutânea.

**2ª Imunização:** 10 mg/dL de antígeno AGPA pura diluído em 0,5 mL de solução Salina (NaCl a 0,85 %) e misturada em 0,50 mL de adjuvante completo de Freund por meio de injeção subcutânea.

**3ª Imunização:** 15 mg/dL de antígeno AGPA pura diluído em 1 mL de solução Salina (NaCl a 0,85 %) e misturada em 1 mL de adjuvante incompleto de Freund por meio de injeção subcutânea.

**4ª Imunização:** 15 mg/dL de antígeno AGPA pura diluído em 1 mL de solução Salina (NaCl a 0,85 %) e misturada em 1 mL de adjuvante incompleto de Freund por meio de injeção subcutânea.

**5ª Imunização:** 25 mg/dL de antígeno AGPA pura diluído em 1 mL de solução Salina (NaCl a 0,85 %) e misturada em 1 mL de adjuvante completo de Freund por meio de injeção subcutânea.

**6ª Imunização:** 25 mg/dL de antígeno AGPA pura diluído em 1 mL de solução Salina (NaCl a 0,85 %) e misturada em 1 mL de adjuvante incompleto de Freund por meio de injeção subcutânea.

### **2.3 Fase C – Seqüência das Sangrias**

Os coelhos foram sangrados na artéria central da orelha antes da primeira e da terceira inoculação e após sete dias da ultima inoculação. Foram coletados aproximadamente 5 mL de sangue em cada sangria.

Ao final de todas as imunizações foi realizada a sangria branca, onde os coelhos foram anestesiados e em seguida realizada uma punção cardíaca, na do qual foi extraído todo o sangue do animal, procedimento este realizado por um médico veterinário

### **2.4 Fase D – Avaliação da resposta imunológica dos coelhos**

As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e analisadas para a detecção da anticorpos anti AGPA. O estudo da resposta imunológica dos coelhos foi realizada no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da BioTécnica pela técnica de imunodifusão dupla e turbidimetria realizada nos aparelhos COBAS MIRA E FEMTO.

#### **2.4.1 Comportamento cinético**

Em espectrofotômetro marca FEMTO – filtro 340 nm, foi realizado a leitura da absorvância de 2 mL de soro do coelho previamente diluído 1:40 com tampão padronizado (BioTécnica) após a adição de 100 µL de calibrador multiparâmetro médio (ROCHE) diluído previamente em solução salina (conforme anexo B) imediatamente e a cada minuto, durante 20 minutos, mantendo o tubo de reação em banho de água a 37° C. Este procedimento foi realizado da mesma forma para os soros obtidos das sangrias realizadas antes da primeira imunização, antes da terceira imunização e após a sexta imunização.

O método acima foi utilizado também com o soro purificado diluído 1:40 e 1:25 (85 µL de soro purificado diluído previamente em 2 mL de tampão padronizado BioTécnica).

### 2.4.2 Exatidão

Em espectrofotômetro autoanalisador marca Roche modelo COBAS MIRA S. foi realizada a calibração com soros controles (calibradores): controle 1 – marca BioRad Nível 2 – lote: 52222 validade: 05/2007; controle 2 – marca BioRad nível 3 – lote: 52223 validade: 05/2007; controle 3 – marca CMM – lote 20N33 validade: 05/2007; controle 4 – marca Cal AltB – lote 20311 validade: 06/2007; controle 5 – marca Cal AltB nível 1 – lote: 46897 validade: 10/2006. Em seguida foi dosado o AAGPA do soro purificado.

### 2.4.3 Linearidade

A linearidade foi feita em espectrofotômetro FEMTO, onde foram dosadas com calibrador puro, com concentração de 1040 mg/dL, diluído a 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 em solução salina. Foi usado como reagente de trabalho uma solução contendo o soro AAGPA da pesquisa diluído 1:25 em tampão padronizado BioTécnica. As diferentes diluições do calibrador puro foram utilizadas como amostras.

### 2.5 Fase E – purificação do antissoro.

A técnica de purificação do antissoro foi realizada no laboratório da BioTécnica e teve como intuito purificar o antissoro policlonal obtido após a sangria total do animal.

O procedimento da purificação foi realizado usando sulfato de amônio a 50% conforme anexo C.

### 2.6 Fase F – Avaliação da especificidade do antissoro.

A especificidade foi avaliada pelas técnica de Imunodifusão dupla .

A técnica de imunodifusão dupla em gel de ágar, baseia-se na precipitação que ocorre na região de equivalência Ag-Ac, perpendicular a linha do eixo entre os orifícios, quando o antígeno e o anticorpo se difundem no ágar. O complexo antígeno-anticorpo se apresenta sob a forma de linha ou arco de precipitação. A velocidade de difusão de cada substância é regida pelas leis de difusão e depende da concentração e do tamanho de cada molécula, do tamanho dos poros do gel, da temperatura, da concentração do ágar e de sua pureza de acordo com Ferreira (2001).

Neste procedimento foram utilizadas duas placas de Petri contendo ágar 1%, no qual foram feitos seis orifícios periféricos e um orifício central em cada uma (como mostra a figura a baixo) onde foi adicionado o soro purificado puro, nas seguintes diluições 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32;1:64; 1:128; 1:256; 1: 512; 1:1024; 1:2048 e o antígeno AGPA no centro da placa.

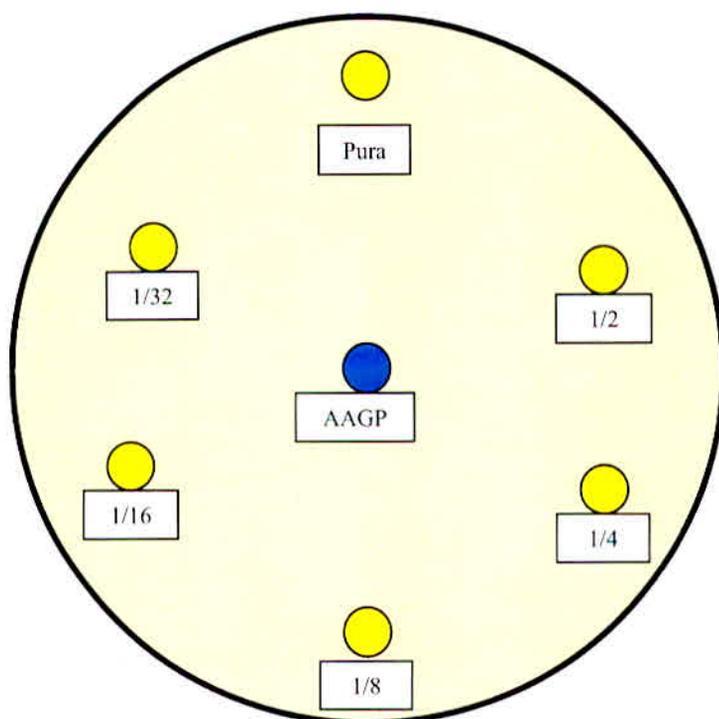


Figura 1 - Placa de imunodifusão I: Mostra as posições do anticorpo anti AGPA puro e em diferentes diluições nos orifícios da placa de Petri.

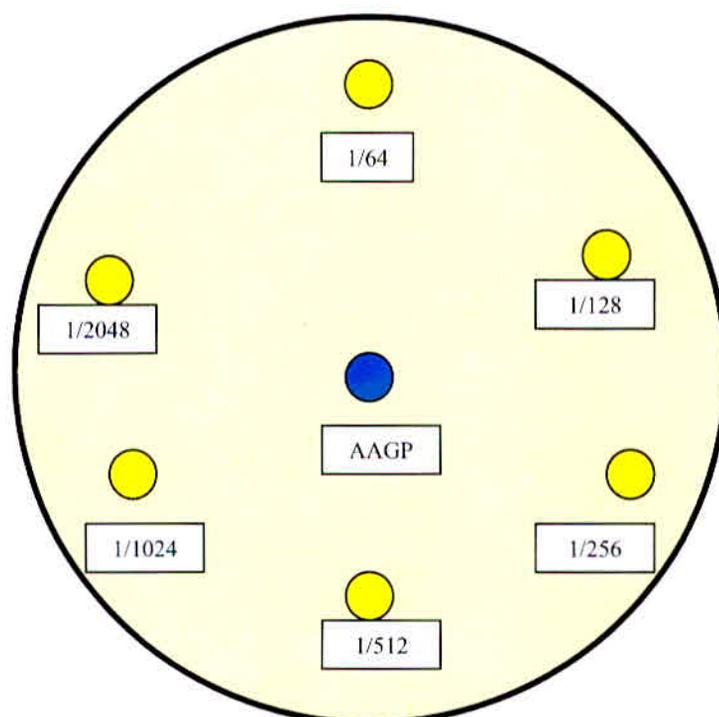


Figura 2 - Placa de imunodifusão II: Mostra as posições dos orifícios nas placas de Petri e as diluições empregadas de 1/64 até 1/2048.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Comportamento cinético

Figuras 3 e 4: Análise do comportamento da reação cinética do anti - soro 1 e anti - soro 2 (diluído 1:25 em tampão padronizado BioTécnica) – antes do processo de imunização.

Este teste foi realizado para avaliar a intensidade da resposta imune do coelho 1 e do coelho 2. Nestes gráficos pode-se perceber que não há presença de anticorpos AAGPA pois não ocorreu reação quando o soro entra em contato com o antígeno AGPA, não ocorrendo elevação da absorvância em função do tempo.

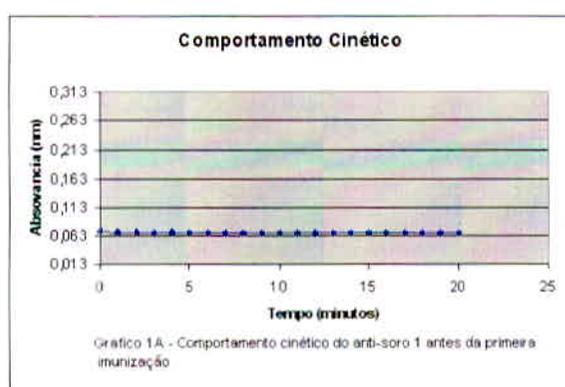


Figura 3 - Comportamento cinético I

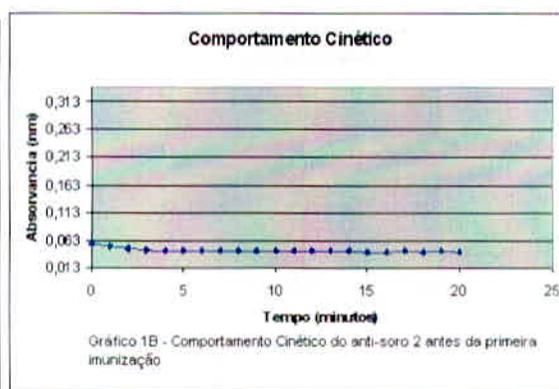


Figura 4 - Comportamento cinético II

Gráfico 5 e 6 : Análise do comportamento de reação cinética do anti - soro 1 e anti - soro 2 (diluído 1:25 em tampão padronizado BioTécnica) - antes da terceira imunização.

Observa-se no gráfico 2 A que embora a reação não tenha atingido um ponto final, ocorreu resposta imunológica e produção de anticorpo AAGPA. Já no gráfico 2B observa-se que a reação atingiu um ponto final, ocorreu resposta imunológica e produção de anticorpo AAGPA. A concentração do anticorpo produzido aparece baixa em ambos os gráficos pois foram realizadas apenas duas imunizações.

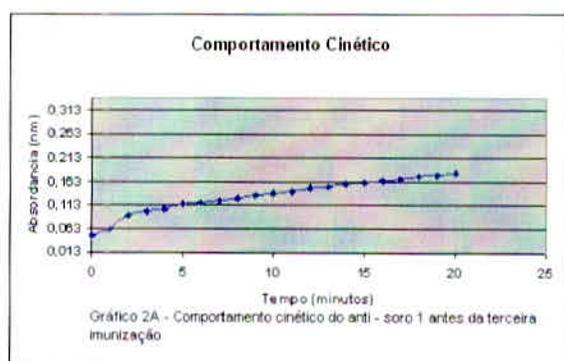


Figura 5 - Comportamento cinético III

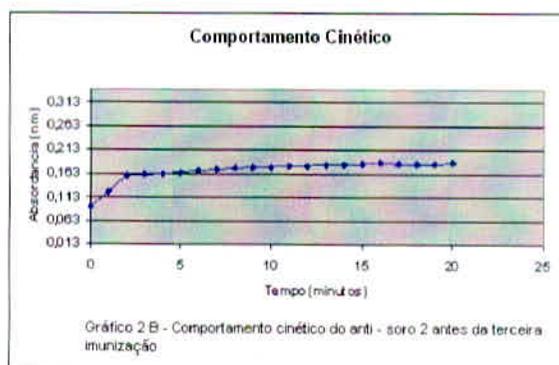


Figura 6 - Comportamento cinético IV

Figuras 7 e 8: Análise do comportamento da reação cinética do anti - soro 1 e anti - soro 2 (diluído 1:25 em tampão padronizado BioTécnica) após a sexta imunização.

Observa-se que mesmo não atingindo o ponto final a reação é mais intensa quando comparada às reações dos gráficos anteriormente analisados, pois após a sexta imunização ocorreu um maior estímulo da resposta imunológica dos coelhos.

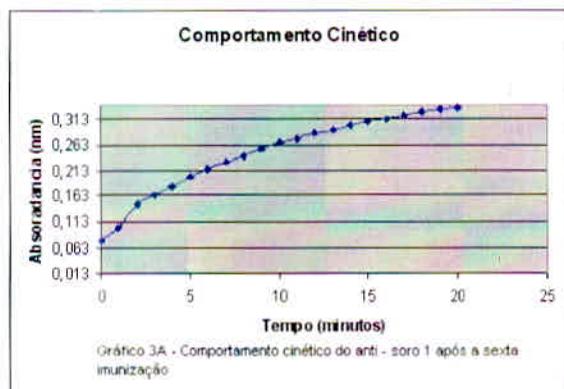


Figura 7 - Comportamento cinético V

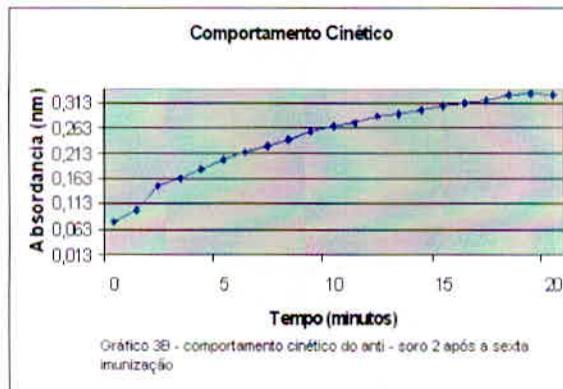


Figura 8 - Comportamento cinético VI

Figura 9 e 10: Análise do comportamento cinético do reagente de trabalho composto de anti - soro purificado diluído 1:25 no tampão padronizado BioTécnica.

No gráfico 4A observa-se grande concentração de anticorpos como no gráfico 3A. Já no gráfico 4B observa-se menor concentração de anticorpos (porém mais específicas) quando comparado ao gráfico 3B, isso deve-se provavelmente a resposta imunológica do animal.

O reagente de trabalho (anti - soro purificado e tampão BioTécnica) ainda não está otimizado em relação à estabilidade da reação, uma vez que a reação continua ocorrendo com o passar do tempo, não atingindo ainda um ponto final.

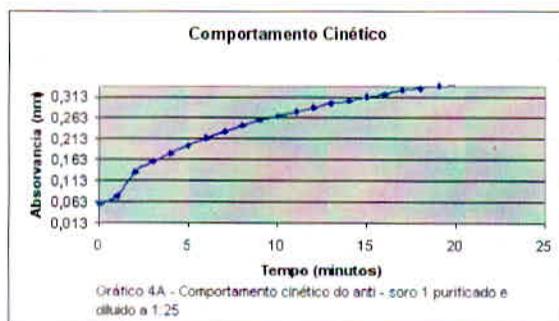


Figura 9 - Comportamento cinético VII

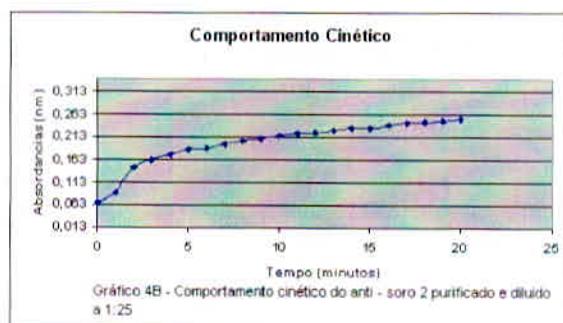


Figura 10 - Comportamento cinético VIII

Figura 11 e 12 : Análise do comportamento cinético do reagente de trabalho do soro diluído 1:40 em absorvância em relação ao tempo.

Observa-se que a reação foi menor devido a maior diluição do reagente de trabalho, conseqüentemente resultando em uma menor concentração de anticorpos.

Esta diluição foi realizada com o intuito de avaliar se a reação poderia estar sendo inibida por excesso de anticorpos (efeito prozona) e também para otimizar o ponto final.

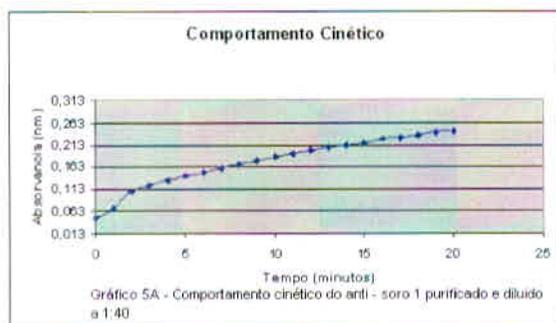


Figura 11 - Comportamento cinético IX

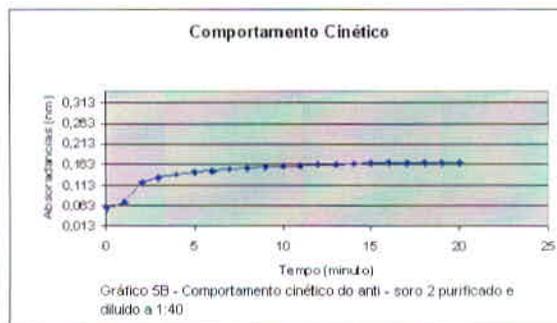


Figura 12 - Comportamento cinético X

### 3.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um determinado método quantificar as maiores concentrações possíveis de um determinado analito sem que seja necessária a diluição da amostra.

Tabela 1: Resultados de linearidade do antissoro 1, referentes ao gráfico 6A.

Diluições do calibrador ROCHE		
Concentrações	Diluições	Absorvância
1040	Puro	0,518
520	1:2	0,341
260	1:4	0,288
130	1:8	0,168
65	1:16	0,088
32,5	1:32	0,056
16,3	1:64	0,039

Tabela 2: Resultados de linearidade do antissoro 2 referentes ao gráfico 6B.

Diluições do calibrador ROCHE		
Concentrações	Diluições	Absorvância
1040	Puro	0,459
520	1:2	0,315
260	1:4	0,185
130	1:8	0,117
65	1:16	0,085
32,5	1:32	0,052
16,3	1:64	0,033

Figuras 13 e 14: Observa-se que os gráficos apresentaram linearidades semelhantes, embora estas ainda não se adequaram aos padrões de controle de qualidade, sendo o ideal uma linearidade até 200 mg/dL para kit da AGPA, o que demonstra a necessidade de ajustes técnicos do regente de trabalho.

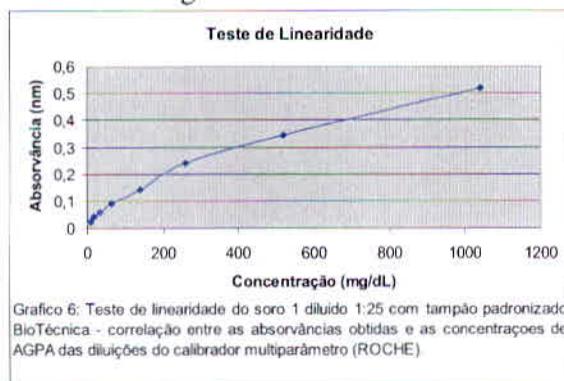


Figura 13 – Linearidade do anti-soro 1

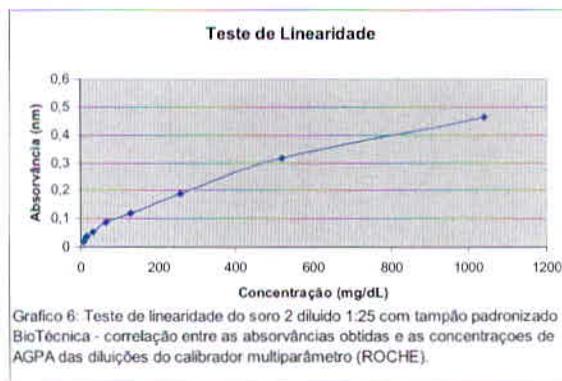


Figura 14 - Linearidade do anti-soro 2

### 3.3 Teste de exatidão

A exatidão caracteriza-se como o grau de concordância entre o valor encontrado ou medido de um material e o valor verdadeiro dos materiais de controle.

A tabela 4 consiste na avaliação da performance do reagente de trabalho através da dosagem de soros controles Calibrador multiparâmetro médio (CMM), BioRad nível 2, BioRad nível 3, Calibrador Alto BioTécnica e Cal Alt B1 realizado no Cobas Mira.

Os resultados obtidos nos testes de exatidão do antissoro 1 com os soros controles apresentaram valores superiores ao valores de referência, sugerindo a necessidade de padronização do reagente de trabalho.

Tabela 3 - teste de exatidão do antissoro 1

Fornecedor	Intervalo de referencia	Resultados
CMM	83-125 mg/dL	140 mg/dL
BioRad 2	53-80 mg/dL	99,5 mg/dL
BioRad 3	70-105 mg/dL	141 mg/dL
Cal AltB	153 mg/dL	177 mg/dL
Cal AltB 1	76,5 mg/dL	107 mg/dL

A tabela 5 consiste na avaliação da performance do reagente de trabalho através da dosagem de soros controles Calibrador multiparâmetro médio, BioRad nível 2, BioRad nível 3, Calibrador Alto BioTécnica e Cal Alt B1.

Os resultados obtidos nos testes de exatidão do antissoro 2 com soros controles CMM e BioRad 3 apresentaram valores dentro da faixa de referência enquanto que o BioRad2, Cal Alt B e Cal Alt B 1 apresentaram valores inferiores aos valores de referência, sugerindo a necessidade de padronização do reagente de trabalho.

Tabela 4 - Teste de exatidão antissoro 2

<b>Fornecedor</b>	<b>Faixa de Referência</b>	<b>Resultados</b>
CMM	83-125 mg/dL	99 mg/dL
BioRad 2	53-80 mg/dL	93 mg/dL
BioRad 3	70-105 mg/dL	96,5 mg/dL
Cal Alt B	153 mg/dL	108 mg/dL
Cal Alt B 1	76,5 mg/dL	69 mg/dL

### 3.4 Imunodifusão dupla ou OUCHTERLONY

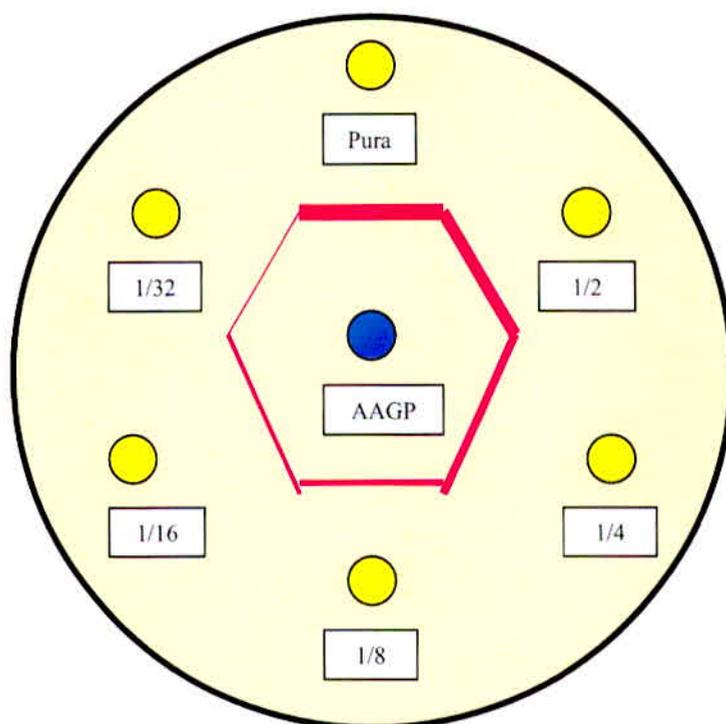


Figura 15: Reação de Imunodifusão dupla

A figura 15 demonstra a reação de imunodifusão dupla do antissoro 1 e antissoro 2 com o intuito de verificar a especificidade do anticorpo.

Observa-se que a presença de linhas de precipitação ocorreu até a diluição 1:32. A ausência de linhas de precipitação paralelas à linha de reação indica que não houve reação cruzada, portanto o anticorpo é específico para AGPA. Também foi possível verificar que a reação até a diluição de 1:32 é um bom título de anticorpo para a fabricação de reagente para trabalho de turbidimetria.

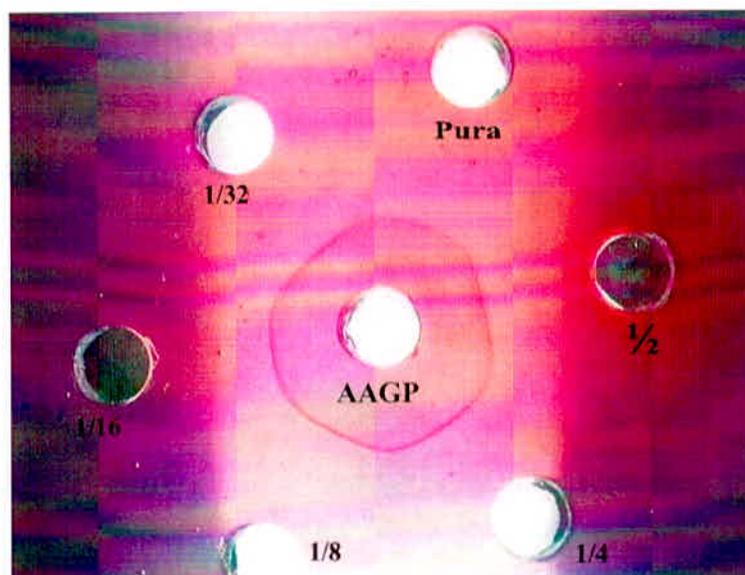


Figura 16 - Resultados das imunodifusões dupla do antissoro 1

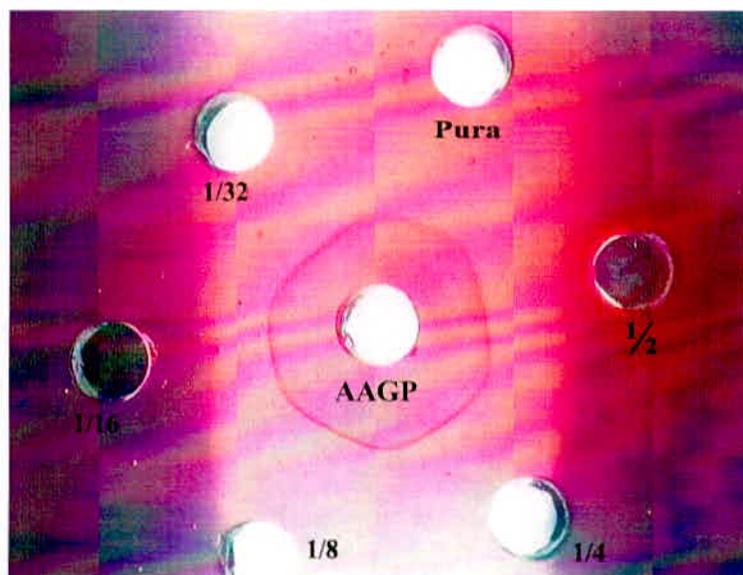


Figura 17 - Resultados das imunodifusões dupla do antissoro 2

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que houve a produção de antissoro AAGPA, porém o reagente de trabalho em questão necessita de ajustes, afim de que apresente performance segura e efetiva para seu uso pretendido cumprindo os requisitos para a sua utilização específica que é a utilização do reagente imunoturbidimétrico para diagnóstico "IN VITRO". Atualmente, exames laboratoriais tornaram-se ferramentas imprescindíveis a uma prática médica de alto nível. As decisões clínicas críticas são, cada vez mais freqüentemente tomadas mediante a avaliação de parâmetros laboratoriais. É de suma importância a utilização de reagentes que atendam a requisitos de garantia de qualidade, com a finalidade de gerar resultados seguros e eficazes.

## REFERÊNCIAS

- BOREL, J.P. et al. **Como Prescrever e interpretar um exame laboratorial**. 2. ed. São Paulo: Andry, 1987.
- BURTIS, C.A; ASHWOOD, E.R. **Tietz textbook of clinical chemistry**. 3. ed. Filadélfia: Saunders, 1999.
- Chmid, K. **Alpha 1 – acid glycoprotein: Genetics, Biochemistry, Physiological Functions and Pharmacology** Liss Inc. New York: Semin. Hemat , 1989.
- DOWNTON, S.R et al. **Acute phase reactants and inflammation and infection**. New York: Semin. Hemat, 1988.
- ENGLEBIENNE, P. et al. **Water-soluble conductive polymer homogeneous immunoassay**. *Jornal of Immunological methods*: n.191; 1997.
- FERREIRA, Antonio Walter; ÁVILA, Sandra do Lago Morais. **Diagnóstico laboratorial: Avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-imunes. Correlação clínico-laboratorial**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- GORINA, A.B. **A Clínica e o laboratório** 16. ed. São Paulo: Medsi, 1996.
- HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e laboratoriais**. 18. ed. São Paulo: Manole, 1995.
- MASSON, P. L,y et al. Particle counting immunoassay (PACIA). **Imunoassay methods**, New York, vol 74, 1981.
- PICHETH, Geraldo, *et al.* Mucoproteína versus alfa-1-glicoproteína ácida: o que quantificar? **J. Bras. Patol. Med. Lab.** [online]. 2002, vol.38, no.2 [citado 28 Maio 2006], p.87-91. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442002000200004&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442002000200004&lng=pt&nrm=iso)>. ISSN 1676-2444.
- RITCHIE, R.F. et al. Reference distributions for the positive acute phase serum proteins, alpha-1-acid glycoprotein (orosomucoïd), alpha-1-antitrypsin, and haptoglobin: a practical, simple, and clinically relevant approach in a large cohort. **J. Clin. Lab. Anal.**, [S.l.], vol 14, 284-920, 2000.
- WESTGARD JO. et al . A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. **Clin Chem.** [S.l.], vol 27, 30 de abril 1981, pag 493-501, 1981.

## ANEXO A - Adjuvante de Freund

Princípio da técnica: Os adjuvantes proporcionam ao antígeno emulsificado uma liberação mais lenta, durante um maior período de tempo. A adição da micobactéria a este adjuvante (completo) faz com que aumente a resposta imune aos antígenos, particularmente aos antígenos solúveis.

Reagentes:

- Adjuvante completo de Freund – é uma suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* em óleo mineral (MARCOL 52) e um agente emulsionante (MONTANIDE 888). É preparado de acordo com a técnica de FREUND que utiliza *M. tuberculosis* H 37 Ra no lugar do *M. butyricum*.

MONTANIDE.....	15 mL
Óleo Mineral ( MARCOL 52) .....	85 mL
<i>M. tuberculosis</i> H 37 Ra (morto e dessecado) .....	0,100 g

- Adjuvante incompleto de Freund – é similar ao adjuvante completo, sem a adição do *M. tuberculosis*

## **ANEXO B - Diluições para teste de comportamento cinético.**

### **Diluição 1:40**

- Solução 1: Diluição de 50  $\mu\text{L}$  de calibrador multiparâmetro (Roche) em 500  $\mu\text{L}$  de solução salina .
- Solução 2: Diluição de 50  $\mu\text{L}$  de soro do coelho em 2000  $\mu\text{L}$  de tampão padronizado BioTécnica .

1 Leitura do Branco: solução 2

2 Leitura a cada minuto, durante 20 minutos: 100  $\mu\text{L}$  da solução 1 adicionado na solução 2.

### **Diluição 1:25**

- Solução 1: Diluição de 50  $\mu\text{L}$  de calibrador multiparâmetro (Roche) em 500  $\mu\text{L}$  de solução salina .
- Solução 2: Diluição de 85  $\mu\text{L}$  de soro do coelho em 2000  $\mu\text{L}$  de tampão padronizado BioTécnica .

1 Leitura do Branco: solução 2

4 Leitura a cada minuto, durante 20 minutos: 100  $\mu\text{L}$  da solução 1 adicionado na solução 2.

### **ANEXO C - Procedimento da purificação.**

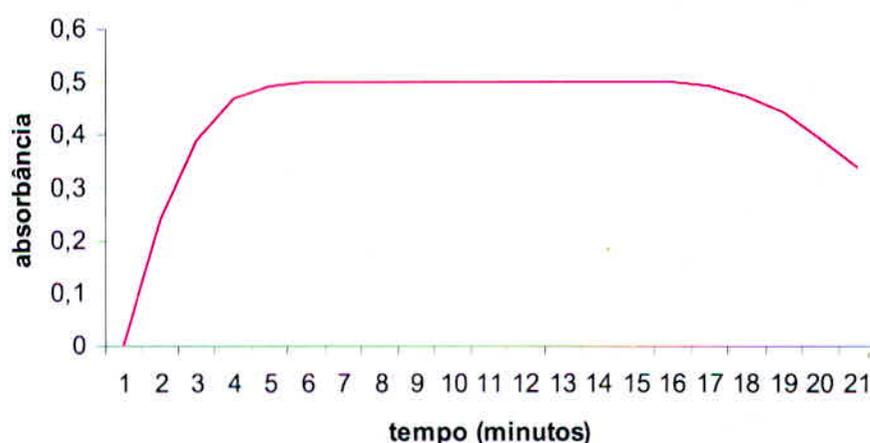
- 1 Coloca-se 10 mL do soro do coelho em um béquer de 500 mL e acrescente uma barra magnética.
- 2 Acomoda-se o béquer em um recipiente contendo gelo.
- 3 Coloca-se este sistema sobre um agitador magnético.
- 4 Durante agitação acrescente o 10 mL de sulfato de amônio gota a gota.
- 5 Deixa-se agitar por 20 minutos.
- 6 Centrifuga-se por 30 minutos a 3000 rpm.
- 7 Despreza-se o sobrenadante.
- 8 Acrescenta-se sulfato de amônio a 50% e centrifugue durante 15 minutos a 3000 rpm.
- 9 Despreza-se o sobrenadante.
- 10 Repete-se a lavagem 3 vezes.
- 11 Ressuspender com 3 mL de tampão fosfato pH 7,2.

Obs: Purifica-se 0,3 a 0,5 % do valor inicial do soro.

## ANEXO D – Comportamento cinético

Segundo o manual da Labtest (Serviço de Apoio ao Cliente Labtest – 2003) a reação de ponto final é especialmente dedicada aquelas reações que formam um produto cuja concentração chega a um ponto máximo, permanecendo inalterada por um determinado tempo em função da estabilidade do produto. Estas reações podem ser colorimétricas ou ultravioleta (UV). Um número bastante elevado de ensaios utiliza as reações de ponto final e a concentração do produto formado é medida através de leituras fotométricas. A reação de ponto final é a mais empregada no laboratório devido a sua flexibilidade de aplicação instrumental, pois pode ser utilizadas em metodologias manuais e automatizadas.

### Reação de Ponto final



O gráfico de ponto final padrão. Mostra o início da formação do produto em A, o ponto B ate o ponto C marca o período de estabilidade onde a medida fotométrica é realizada. A partir do ponto C a estabilidade do produto e perdida.