

EDINÉA PASTRO MENDES

PROPOSTA DE METODOLOGIAS PARA O CONTROLE DE MATÉRIAS-PRIMAS A SEREM UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE CONJUGADOS DE ANTICORPOS POLICLONAIS DE CABRA COM PEROXIDASE DE RAIZ FORTE

**PPGVS/INCQS
2010**

PROPOSTA DE METODOLOGIAS PARA O CONTROLE DE MATÉRIAS-PRIMAS A SEREM UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE CONJUGADOS DE ANTICORPOS POLICLONAIS DE CABRA COM PEROXIDASE DE RAIZ FORTE

Edinéa Pastro Mendes

Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Maria Aparecida Affonso Boller

Rio de Janeiro
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

PROPOSTA DE METODOLOGIAS PARA O CONTROLE DE MATÉRIAS-PRIMAS A SEREM UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE CONJUGADOS DE ANTICORPOS POLICLONAIS DE CABRA COM PEROXIDASE DE RAIZ FORTE

Edinéa Pastro Mendes

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado:

Prof. – Lucia Maria Correa Werneck - INCQS/FIOCRUZ

Prof. – Roberto Calado da Silva – BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ

Prof. – Michel Vergne Félix Sucupira – BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ

Orientadora: Maria Aparecida Affonso Boller – INCQS/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Mendes, Edinéa Pastro

Proposta de metodologias para o controle de matérias-primas a serem utilizadas na produção de conjugados de anticorpos policlonais de cabra com peroxidase de raiz forte / Edinéa Pastro Mendes. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2010.

xiv, 35p. , il. , graf.

Trabalho de conclusão de Curso (Especialização em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadora: Maria Aparecida Affonso Boller.

1. Ensaio sorológico. 2. Raiz Forte.

À Deus pela força e coragem nas horas mais difíceis
Aos meus filhos e ao meu marido pela paciência nos momentos em que foi
necessária a minha dedicação ao trabalho
Aos meus pais, por todo amor, carinho, dedicação, compreensão, apoio e
incentivo.

AGRADECIMENTOS

À MSc Maria aparecida Affonso Boller pela orientação, atenção e paciência.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS / FIOCRUZ

Aos meus chefes Raouf Emile Sykora, Marco Antonio Lemos de Andrade e Claudia Moraes Molinaro por todo apoio, carinho, respeito e compreensão.

Aos amigos Hilton Jorge do Nascimento e Edimilson Domingos da Silva pela co-orientação e pelos importantes conhecimentos transmitidos sem os quais não seria possível a realização deste trabalho

À Renata Chagas Bastos pela essencial ajuda, colaboração e carinho.

Aos amigos Rafael Resende e Sany Verônica pela amizade e ajuda.

Aos amigos Felipe, Simone, Luciellen, Elaine, Renata e Ana pelo apoio e amizade.

À amiga Cláudia Bastos Barroso por toda ajuda, amizade, carinho e paciência.

À equipe do SESOD, LAFIQ e LACORE.

À todos os amigos de Bio-manguinhos pelo apoio, carinho, amizade, cooperação.

Aos amigos de turma do Curso de Especialização em Vigilância Sanitária do INCQS pelo carinho e amizade.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta Dissertação.

RESUMO

Os reagentes para diagnóstico são baseados em reações químicas, bioquímicas e imunológicas, para a obtenção de resultados para a avaliação clínica de determinadas patologias. Entre os imunoenaios, o ensaio imunoenzimático (EIE) é um dos métodos mais utilizados para o diagnóstico de diversas doenças. Bio-Manguinhos produz e distribui *kits* de EIE para o Ministério da Saúde, estes *kits* são compostos de placas ELISA revestidas com antígenos específicos, soros controle positivos e negativos, cromógeno (tetrametilbenzidina), peróxido de hidrogênio, imunoglobulina G anti-IgG humana ou anti-IgG canina conjugada com peroxidase e soluções para a execução do método. Embora as metodologias que culminam na produção dos *kits* EIE sejam bem definidas, alguns controles de processos não foram padronizados ou devem ser revistos. Nesse sentido, duas metodologias – espectroscopia por UV e quantificação da atividade enzimática - foram testadas para avaliar três compostos utilizados no processo de conjugação e na etapa da revelação de EIE – TMB, água oxigenada e peroxidase respectivamente. Os controles da quantidade de TMB e peróxido de hidrogênio foram feitos por espectrofotometria de UV, utilizando como parâmetro o coeficiente de extinção destas espécies. Esta metodologia provou ser mais rápida que a titulação de peróxido de hidrogênio realizada pelo Laboratório de Controle Físico-Químico. A avaliação de diversos lotes de TMB mostrou que o método proposto pode ser utilizado como parâmetro de controle de insumos intermediários, evitando o retrabalho ou reprovação de um lote inteiro do reativo para diagnóstico. O controle proposto para a enzima peroxidase foi a quantificação da atividade enzimática, utilizando como substrato pirogalol. Neste caso, os lotes da enzima com atividade biológica menor que a descrita pelo fornecedor, podem ser eliminados para evitar desperdício de tempo e de reagentes utilizados no processo de conjugação. Os controles sugeridos nesta dissertação podem oferecer uma melhor qualidade do produto final e diminuir o número de lotes reprovados.

ABSTRACT

The reagents for diagnosis are based on chemical, biochemical and immunological reactions, to obtain results to help clinical evaluation of some pathologies. Among the immunoassays, the enzyme immunoassay (EIA) is one of the most used methods for diagnosis of several diseases. Bio-Manguinhos produces and distributes EIA *kits* for the Health Ministry, these *kits* are composed by EIA plates coated with specific antigens, positive and negative serum control, chromogen (tetramethylbenzidine), hydrogen peroxide, immunoglobulin G anti-human IgG or anti-canine IgG conjugated with horseradish peroxidase and solutions for the method execution. Although the methodologies that culminate in the production of the EIA *kits* were well defined, some process controls are not implemented or must be reviewed. In this sense, two methodologies were tested to evaluate three compounds used in the conjugation process and in the EIA revelation steps. The Control of the amount of TMB and hydrogen peroxide was made by UV spectrophotometry using as parameter the coefficient of extinction of these species. This methodology proved to be faster than the hydrogen peroxide titration assay performed by the Physical-Chemical Control Laboratory. The evaluation of several TMB lots showed that the proposed method can be used as a control parameter of intermediate inputs by avoiding rework or reprovation of an entire lot of diagnostic assay. The proposed control for the enzyme horseradish peroxidase was the quantification of enzyme activity, using pyrogallol as the substrate.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema para ensaio de imunofluorescência indireta	03
Figura 2 - Esquema para reação positiva para um típico ensaio de EIE para Doença de Chagas. Na reação negativa não há formação do complexo antígeno – amostra do paciente, logo não há reação com o conjugado	04
Figura 3 - Esquema da imunocromatografia empregada para o teste rápido de HIV produzido em Bio-Manguinhos	04
Figura 4 –Representação gráfica da IgG	10
Figura 5 –Representação fotográfica da planta de onde se extrai a peroxidase de raiz forte	11
Figura 6 – Representação das reações de oxidação do pirogalol e ABTS catalisadas por peroxidase	12
Figura 7 – Estrutura da 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina	13
Figura 8 – Cinética de oxidação do pirogalol pela água oxigenada na presença da enzima HRP	23

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Características básicas de um Reagente para Diagnóstico	01
Tabela 2 - Avaliação da concentração de amostras de TMB produzidas em Bio-Manguinhos	21
Tabela 3 - Resultado da determinação de atividade enzimática de HRP com o pirogalol como substrato. Os números de 1 a 3 ao lado do nome da amostra servem apenas para indicar que foi preparada uma mesma amostra da enzima em diferentes momentos.	22

SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
µL	Microlitros
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
ARN	Ácido Ribonucléico
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios
DIPFR	Divisão de Processamento Final de Reativos
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EIA	Immunosorbent assay
EIE	Ensaio Imunoenzimático
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
GGSTO	Gerência Geral de Sangue outros Tecidos e Órgãos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidase de raiz-forte)
IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INCQS	Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LACORE	Laboratório de Controle de Reativos
LAFIQ	Laboratório Físico-Químico
LAMAM	Laboratório de Macromoléculas
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	nanômetros
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico

PN	Programa Nacional
PRM	Protocolo de registro de material
PTN	Proteína
SEICA	Seção de Insumos, Conjugados e Apoio
SESOD	Seção de Soluções e Diluentes
TMB	Tetrametilbenzidina
UV	Ultra-violeta
UV-VIS	Ultra-violeta visível
V	Volume
WFI	<i>Water for Injection</i> (água para injetáveis)

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1 – Reativos para diagnóstico	01
1.2 - Principais metodologias empregadas para imunodiagnósticos	02
1.2.1 – Imunofluorescência indireta (IFI)	02
1.2.2 – Ensaio imunoenzimático (EIE)	03
1.2.3 – Imunocromatografia e fluxo lateral (Teste rápido)	04
1.2.4 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)	05
1.3 – Reativos para diagnóstico em Bio-Manguinhos	05
1.3.1 – ELISA Leishmaniose canina e humana	06
1.3.2 – ELISA IgM Leptospira	06
1.3.3 – Painéis sorológicos	06
1.3.4 – IFI-HIV-1	07
1.3.5 – Teste rápido HIV – 1/2	07
1.4 – Produção de conjugados em Bio-Manguinhos	07
1.5 - Matérias primas utilizadas para a conjugação com peroxidase e revelação do ensaio.	09
1.5.1 – Imunoglobulinas	09
1.5.2 – Peroxidase de Raiz Forte	10
1.5.3 – 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina (TMB)	12
1.5.4 – Peróxido de hidrogênio	13
1.6 – Produção de conjugados com peroxidase na Seção de Insumos, Conjugados e Apoio (SEICA) de Bio-Manguinhos	14
1.6.1 – Obtenção de soro anti-humano e imunização de animais	14
1.6.2 – Titulação de Soros para teste da resposta imune de animais	14
1.6.3 – Precipitação por sulfato de amônio e cromatografia	14
1.6.4 – Conjugação à peroxidase e Titulação do Conjugado	14
1.6.5 – Controles de processo, envase e rotulagem	15
1.6.6 – Validade e armazenamento	15
1.7 – Justificativa	16
2 – Objetivos	17
2.1 – Geral	17
2.2 – Específicos	17
3 – Materiais e Métodos	18

3.1 – Determinação da concentração de 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina	18
3.2 – Determinação da concentração de H ₂ O ₂	19
3.3 – Determinação da atividade enzimática	19
4 – Resultados	21
5 – Discussão	24
6 – Conclusão	27
7 – Referências	29
Anexo I – Fluxograma de montagem dos <i>Kits</i> de Elisa do DERED e seus pontos de controle (em azul)	32
Anexo II – Fluxograma de montagem dos <i>Kits</i> de Elisa do DERED, seus pontos de controle e os controles de processo sugeridos (em vermelho)	33
Anexo III – Tabela detalhada quantificação dos lotes de TMB produzidos no SESOD por espectrofotometria no UV.	34

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Reativos para diagnóstico

Os reagentes para diagnóstico correspondem ao conjunto de insumos que utilizam reações químicas, bioquímicas, imunológicas ou biológicas “*in vitro*”, para obter resultados de apoio às avaliações clínicas em pacientes. Essas reações são obtidas através de interações entre antígenos e anticorpos. Os antígenos são obtidos a partir de vírus, bactérias, fungos ou células. Os reagentes para diagnóstico desempenham funções importantes para a saúde pública e na vigilância epidemiológica, por meio de identificação e monitoramento de doenças, e na avaliação da qualidade de sangue em Serviços de Hemoterapia (MEDEIROS, 2004).

Para cumprir adequadamente o seu papel, um reagente para diagnóstico deve possuir algumas características básicas que determinarão sua qualidade e terão influência decisiva nos resultados obtidos. Essas características diferenciam os produtos e em alguns casos determinam a sua aplicação. Na Tabela 1 pode ser observado um sumário destas características e detalha sua importância para o produto.

Tabela 1 - Características básicas de um Reagente para Diagnóstico

CARACTERÍSTICAS	IMPORTÂNCIA
Sensibilidade	Quanto maior a sensibilidade, menor a possibilidade de obtenção de resultados “falso negativos”, porém menor a especificidade.
Especificidade	Quanto maior a especificidade, menor a possibilidade de obtenção de resultados “falsos positivos”, porém menor a sensibilidade.
Reprodutibilidade	Manter características homogêneas entre os diversos lotes de produção e/ou obter resultados similares por diferentes usuários.
Repetitividade	Apresentar resultados com variações mínimas e dentro faixas aceitáveis em vários ensaios em um mesmo ensaio.
Estabilidade	Maior estabilidade do produto influencia positivamente em seu prazo de validade e as condições de armazenamento.
Simplicidade	Facilitar a realização e leitura do teste pelo usuário.
Resultado Rápido	Propiciar uma intervenção terapêutica mais rápida.

Fonte: MEDEIROS, 2004.

1.2 - Principais metodologias empregadas para imunodiagnósticos

Testes Sorológicos:

Os testes sorológicos ou imunoenaios são técnicas para detecção e a quantificação de antígenos (substância química ou orgânica capaz de produzir anticorpos) e anticorpos (substância do sangue capaz de destruir bactérias), ou outras substâncias que desempenham o papel de antígeno no ensaio, tais como drogas, hormônios, ácidos nucleicos, citocinas, receptores de células, etc. Podem utilizar reagentes não-marcados ou reagentes marcados. Com relação aos métodos, tem-se observado uma tendência ao aperfeiçoamento e a consolidação dos testes já existentes, e ao mesmo tempo, de emprego de tecnologia emergentes, a fim de aumentar o nível de sensibilidade e de confiabilidade dos resultados obtidos e tornar os testes mais rápidos, de mais simples execução e adaptáveis a processos automatizados. Os testes sorológicos tem se tornado cada vez mais refinados e de execução simples. Porém, para se garantir a qualidade dos resultados é necessário rigoroso controle e cuidadosa interpretação. Além disso, os testes sorológicos tem sido utilizados com sucesso na pesquisa de anticorpos. Assim, os testes sorológicos tornaram-se auxiliares importantes em processos visando um diagnóstico individual e de pesquisa epidemiológica. As principais técnicas utilizadas em Bio-Manguinhos são: Imunofluorescência indireta, Elisa, Teste rápido e PCR.

1.2.1 - Imunofluorescência indireta (IFI)

Esta metodologia é baseada na pesquisa de anticorpos específicos em soro ou plasma por imunofluorescência. O ensaio consiste na reação do soro ou plasma do paciente com células infectadas ou com parasitos, previamente fixados em lâminas para microscopia. A reação entre o antígeno de membrana fixado e o anticorpo presente na amostra é visualizada após a adição de anticorpo anti-imunoglobulina conjugada com um cromóforo fluorescente, via de regra, o isotiocianato de fluoresceína (MACCRINDLE et al, 1985).

(Figura 1). Os resultados são interpretados como negativo ou positivo pela visualização, com o auxílio de microscópio, de fluorescência de membrana, conforme ilustrado na Figura 2.

Reagente



Não reagente



Figura 1- Esquema para ensaio de imunofluorescência indireta.

1.2.2 - Ensaio imunoenzimático (EIE)

A reação imunoenzimática é a base para muitos testes usados para a identificação de antígenos ou a detecção de anticorpos. O sistema envolve anticorpos conjugados com enzimas. O resultado do teste é determinado por observação (avaliação qualitativa) ou medida espectrofotométrica (avaliação quantitativa) de mudança de cor, produzida pela ação da enzima sobre o seu substrato. O teste pode ser desenvolvido em diversos formatos para detecção de antígenos ou anticorpos (SANTOS et al, 2002).

Os ensaios imunoenzimáticos consistem na reação de soros com antígenos previamente adsorvidos em microplacas (fase sólida) de 96 poços. Em seguida, é adicionada uma anti-imunoglobulina marcada com uma enzima, que pode, na maioria das vezes, ser a peroxidase de raiz forte ou a fosfatase alcalina, que se ligará aos anticorpos do paciente, caso estejam presentes. A reação é evidenciada pela utilização de substâncias cromógenas que reagem na presença do catalisador enzimático. A definição do que é positivo ou negativo é feita em comparação com os controles positivo, negativo e branco do teste. De um modo geral a EIE pode ser esquematizado como observado na Figura 2.

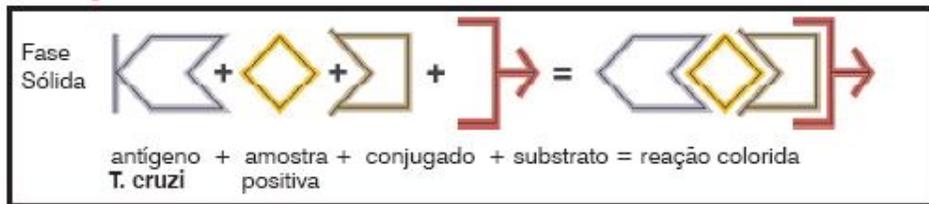


Figura 2 - Esquema para reação positiva para um típico ensaio de EIE para Doença de Chagas. Na reação negativa não há formação do complexo antígeno – amostra do paciente, logo não há reação com o conjugado.

1.2.3 -Imunocromatografia e fluxo lateral (Teste rápido)

Os testes rápidos são imunoenaios baseados na captura de anticorpos específicos para determinadas patologias por antígenos imobilizados em membranas. A diferença entre os testes rápidos, o *dot-blot* e o *western-blot* está no fato de que a amostra do paciente é aplicada distante do ponto no qual o antígeno de captura está fixado e migra por capilaridade até o local de reação juntamente com o conjugado, conforme exemplificado na Figura 3 (IWEALA, 2004).

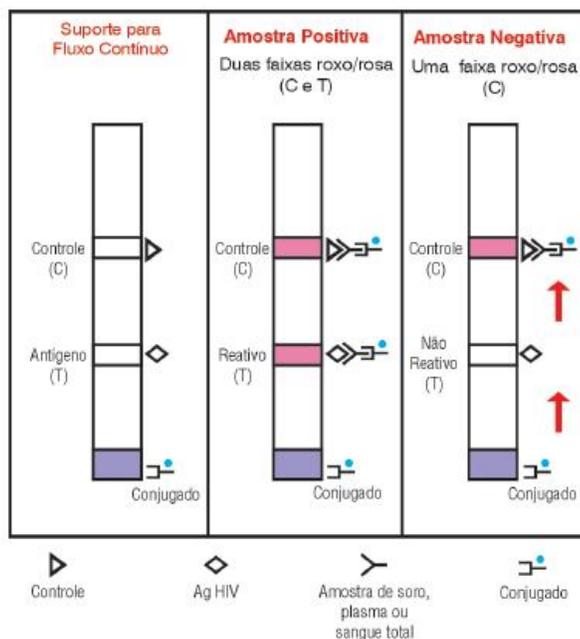


Figura 3 – Esquema da imunocromatografia empregada para o teste rápido de HIV produzido em Bio-Manguinhos.

1.2.4 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR constitui no maior avanço da biologia molecular desde o advento da tecnologia do ADN recombinante. Ela permite que uma simples cópia de qualquer sequência de gene amplificado “*in vitro*” a milhões de cópias em poucas horas. Então o ADN viral extraído de uma quantidade muito pequena de virions ou células infectadas pode ser amplificado ao ponto em que ele pode ser detectado por ensaios de hibridização.

O princípio da hibridização de ácido nucléico é que uma fita simples de ADN se hibridizará com formação de pontes de hidrogênio pareando-se à outra fita simples do ADN (ou ARN) que tenha sequência de bases complementares. O princípio da reação de hibridização consiste em se “produzir sondas”, que são sequências complementares ao ADN ou ARN alvo, marcado com radioisótopos ou enzimas e posterior revelação desta, determinando a presença do ácido nucléico pesquisado.

A PCR é uma reação cíclica que requer um molde de DNA, um tampão, os quatro deoxinucleotídeos trifosfato (deoxiadenosina trifosfato, deoxitimidina trifosfato, deoxicitidina trifosfato e deoxiguanosina trifosfato – dN-TPs) sequências iniciadora ou *primers* e a DNA polimerase. Os *primers* são oligonucleotídeos com sequências que são complementares a sequências específicas, que flanquiam a sequência alvo do DNA que será amplificado. Os *primers* determinam a especificidade e o tamanho do produto amplificado (SANTOS et al, 2002).

1.3 - Reativos para diagnósticos em Bio-Manguinhos

A produção de reativos para diagnóstico em Bio-Manguinhos foi iniciada na década de 80. Com o passar dos anos, a linha de produtos foi ampliada em função da demanda do Ministério da Saúde. Atualmente o Instituto entrega aos diversos programas do Ministério da Saúde cerca de três milhões de reações/ano para a detecção das seguintes doenças: AIDS, leishmaniose, chagas e leptospirose. Os principais reativos para diagnósticos ofertados ao ministério da saúde são: ELISA - Leishmaniose canina e humana, ELISA - IgM Leptospira, Painéis sorológicos, IFI-HIV-1, Teste rápido HIV-1/2 (BIO-MANGUINHOS – Reativos, 2009).

1.3.1 – ELISA - Leishmaniose canina e humana

Os primeiros *kits* de reativos para diagnóstico disponíveis foram os de imunofluorescência indireta (IFI) para leishmaniose canina e humana, além do teste intradérmico com antígeno de Montenegro. A partir destes testes, foram desenvolvidos novos *kits* como o ELISA (EIE), que surgiu na década de 90 e permitiu aos laboratórios ampliar os testes de diagnóstico e inquéritos epidemiológicos. Estes produtos, que eram as únicas alternativas de diagnóstico do Ministério da Saúde, cumpriram um papel estratégico em ações de controle desta grave endemia no país. (BIO-MANGUINHOS – História, 2009).

1.3.2 – ELISA - IgM Leptospira

A leptospirose está atrelada a situações de sazonalidade. Desta forma, havia pouco interesse do mercado privado em fabricar um kit para esta doença. Bio-Manguinhos passou a suprir esta demanda na década de 80, fornecendo ao Ministério da Saúde, primeiramente, *kits* de macroaglutinação. A partir da década de 90, passou a produzir os *kits* ELISA IgM leptospirose (BIO-MANGUINHOS – História, 2009).

1.3.3 - Painéis sorológicos

A experiência de Bio-Manguinhos na área da qualidade permitiu ao Instituto atender às demandas do Ministério da Saúde para estabelecer um trabalho de referência, envolvendo a captação e processamento de plasmas, caracterização de amostras e produção de painéis sorológicos, a partir do início dos anos 90. Esses painéis são destinados aos programas de controle da qualidade de testes sorológicos de diversas patologias. Após análise e validação realizadas pelo Ministério da Saúde, os painéis são remetidos para atender às demandas dos Programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), ligados ao Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids (PN-DST/Aids) e às necessidades da Gerência Geral de Sangue, Outros Tecidos e Órgãos (GGSTO/ANVISA). A partir de 2006, em apoio a Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB/Ministério da Saúde), iniciou-se o Programa de AEQ-Sorologia para os laboratórios que realizam testes de diagnóstico de leishmaniose visceral canina.

1.3.4 - IFI-HIV-1

Em 1986, o Instituto Robert Koch da Alemanha faz a doação das células K 37(não infectadas) e k 37-3/HIV(infectadas), desde então Bio-Manguinhos pôde estabelecer as ações necessárias para implementação do Laboratório Nacional de Referência do Ministério da Saúde que, entre outras atribuições, liderou a formação de uma rede nacional de laboratórios públicos para diagnóstico da infecção pelo HIV. Neste contexto, foram implantados mais de 50 laboratórios em todos os estados do Brasil e mais de 250 técnicos foram treinados. Também foi necessário disponibilizar um kit de diagnóstico para confirmação dos resultados (triagem) como alternativa ao kit de Western Blot, de altíssimo custo e fornecimento restrito. Então, surgiu o teste de imunofluorescência indireta baseado em células KE37-3, que tem cumprido um papel estratégico e significativo quanto à economia de divisas para o país. (BORNENS et al,1989)

1.3.5 - Teste rápido HIV-1/2

Em 2004, Bio-Manguinhos assinou, com a empresa *Chembio Diagnostics*, o contrato de transferência de tecnologia para produção do teste rápido HIV-1/2. O domínio desta tecnologia e a inclusão deste produto em seu portfólio permitirão ao Instituto atender às necessidades do país e reduzir sua dependência tecnológica. O objetivo é ampliar o acesso ao teste através do Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (PN-DST/AIDS), começando pelo programa de prevenção da transmissão vertical do vírus HIV. A nova tecnologia incorporada também poderá ser aplicada ao diagnóstico rápido de outras doenças importantes para a saúde pública, cujo acesso é limitado tanto pelo alto preço dos *kits* quanto pelo desinteresse da iniciativa privada em produzi-los.

1.4 - Produção de conjugados em Bio-manguinhos

A conjugação é um processo que envolve a ligação de duas ou mais espécies para formar um novo complexo com as propriedades combinadas de seus componentes, assim, conjugado entende-se como toda molécula ou macromolécula que passou por um processo de conjugação. Há vários tipos de conjugados, mas para o uso em reativos para diagnósticos os mais

utilizados são os conjugados com enzimas, com fluorocromos ou com partículas como látex ou ouro coloidal. A escolha do conjugado vai depender do uso, por exemplo, para as metodologias baseadas no ELISA os conjugados com enzimas como fosfatase alcalina, peroxidase, β -galactosidase são os mais utilizados.

Nos reativos para diagnósticos distribuídos por Bio-Manguinhos são utilizados basicamente três tipos de conjugados:

- Proteína A com ouro coloidal – empregado nos testes rápidos
- Imunoglobulinas do tipo G com peroxidase de raiz forte – empregados nos diferentes ensaios imunoenzimáticos (Elisa, western-blot e dot-blot).
- Imunoglobulinas do tipo G ou M com fluoresceína – empregada nos ensaios de imunofluorescência.

A peroxidase de raiz-forte (HRP) é a enzima mais utilizada na conjugação com anticorpos secundários para ELISA. As principais vantagens do uso da HRP (Horseradish peroxidase ou peroxidase de raiz-forte) em relação a outras enzimas são:

- Grande variedade de substratos
- Substratos baratos
- Maior estabilidade
- Passível de ser conjugada com outras proteínas por diferentes formas de conjugação
- Produz conjugado estável

O conjugado HRP-IgG se liga ao anticorpo primário, que por sua vez está ligado à proteína-alvo (antígeno adsorvido a placa de ELISA ou presente numa membrana de *western-blot* ou de *dot blot*). A detecção do complexo formado ocorre quando a HRP catalisa a reação de oxidação do substrato após ser ativada pela água oxigenada, provocando uma mudança de cor (SCHUTZ et al, 1997). O processo de conjugação da HRP com imunoglobulinas G pode ser realizado por reação com glutaraldeído, por oxidação com meta-periodato de sódio, por formação de pontes dissulfureto ou por meio de quaisquer agentes ligantes para grupos amino ou tiol. Os conjugados com HRP formados nestes processos são mais estáveis e menores do que os conjugados com fosfatase alcalina ou com β -galactosidase em função do alto teor de glicosilação da HRP, que garante uma maior estabilidade da enzima (HERMANSON, 1996).

1.5 - Matérias primas utilizadas para a conjugação com peroxidase e revelação do ensaio.

1.5.1 - Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são formadas por um grupo de proteínas de origem animal – gama globulinas ou imunoglobulinas. Produzidas por linfócitos e plasmócitos, são capazes de agir como anticorpos específicos, sendo responsáveis pela imunidade humoral a uma série de patologias. São chamadas de imunoglobulinas as proteínas que têm atividade de anticorpos e as que com elas têm relação antigênica. Há cinco classes de imunoglobulinas com funções diferentes (HERMANSON, 1996):

- **IgA**, representa de 15 a 20% do total imunoglobulinas do soro; possui uma cadeia pesada tipo α e 90% dessa proteína está presente no soro, enquanto a outra parte predomina nas secreções nasais, salivares e no leite.
- **IgD**, representa 1% do total das imunoglobulinas no soro, composta de cadeia pesada do tipo δ e está presente em grande quantidade nos linfócitos maduros.
- **IgE**, representa menos de 1% do total das imunoglobulinas do soro, composta de cadeia do tipo ϵ , está presente em grande quantidade na membrana de mastócitos e basófilos.
- **IgM**, representa aproximadamente 10% do total das imunoglobulinas, composta de cadeia do tipo μ e é a imunoglobulina inicial das respostas imunes; atravessa a barreira placentária conferindo imunidade passiva ao feto.
- **IgG** que é a principal imunoglobulina do soro, representando 70 a 75% do total das imunoglobulinas do soro, composta de cadeia pesada do tipo γ , e é a mais importante das respostas imunes secundárias sendo a única da classe antitoxina, e também atravessa a barreira placentária conferindo imunidade passiva ao feto (HARLOW, 1988).

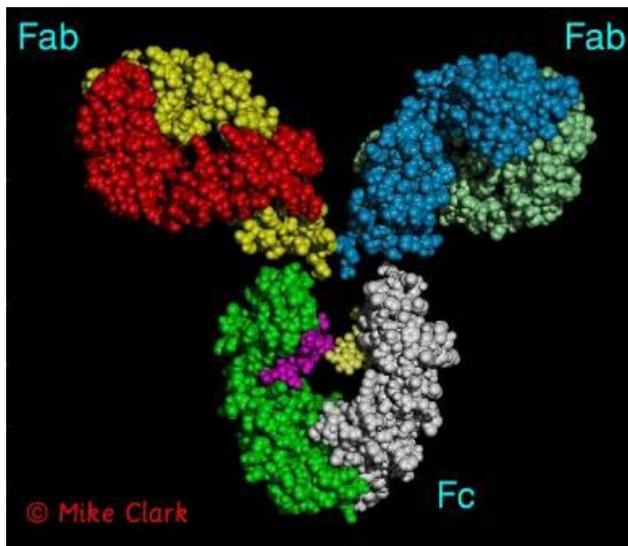


Figura 4 - Representação da IgG

O aumento da Imunoglobulina G tende a predominar nas respostas crônicas de doenças. Diante disto, o conjugado anti-IgG marcado com peroxidase produzido a partir de soros hiperimunes, é utilizado como importante ferramenta em testes imunoenzimáticos de diagnóstico, aproveitando a especificidade deste insumos às imunoglobulinas séricas aumentadas em determinadas patologias, conferindo reatividade nos mesmos (ROQUE et al, 2007) (NUNES, 2005).

1.5.2 - Peroxidase de Raiz forte

A enzima Peroxidase de raiz forte (HRP) é uma glicoproteína isolada de raízes de rábano (*Amaracia rusticana*) e pertence ao grupo das peroxidases que contém ferro protoporfirina como grupamento prostético (Figura 4). Esta proteína consiste de uma única cadeia polipeptídica que contém quatro pontes de dissulfureto, e cerca de 18% de teor glicídico. A HRP apresenta várias isoenzimas, conforme descrito na literatura, podendo variar no teor glicídico ou na porção polipeptídica. São pelo menos, sete isozimas com função de HRP (SHUTZ et al, 1997).

A porção glicídica depende da variedade da planta e do momento em que foi coletada. Apesar das diferenças na composição glicídica, os glicídios mais encontrados na HRP são basicamente a galactose, arabinose, xilose, fucose, manose, manosamina e galactosamina, a proporção entre estes glicídios varia dependendo da isozima em questão.

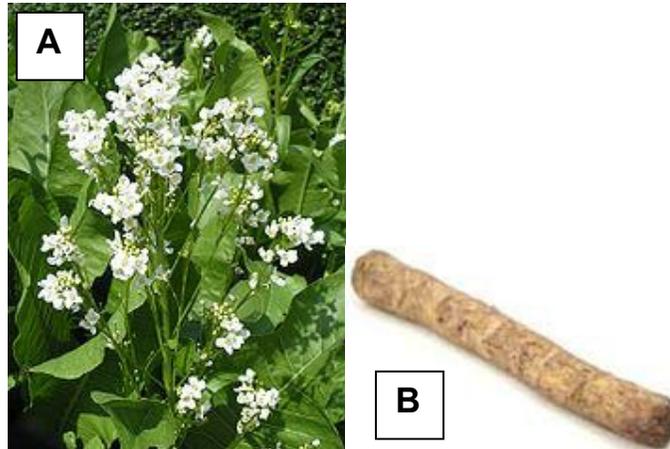


Figura 5 - Representação fotográfica da planta de onde se extrai a peroxidase de raiz forte. (A) *Armoracia rusticana*, (B) Raiz da *A. rusticana*.

O peso molecular médio da HRP é de aproximadamente 44,0 kDa, incluindo a cadeia polipeptídica (33,890 Dalton), o grupamento hemina com Fe^{2+} (~ 700 Dalton) e a porção glicídica (~ 9,400 Dalton). As isoenzimas de HRP apresentam ponto de isoeletrico variando entre 3.0 e 9.0.

De um modo geral, a HRP liga-se ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o complexo resultante [HRP- H_2O_2] pode oxidar uma grande variedade de cromógenos doadores de hidrogênio. O pH ótimo da HRP depende do substrato utilizado, mas de um modo geral varia entre 5,0 e 6,5, sendo que em pH 7,5 sua atividade corresponde a 84% da atividade máxima. A estabilidade das isoenzimas está na faixa de pH entre 5.0 – 9.0 (SHUTZ et al, 1997).

Geralmente a atividade biológica da peroxidase comercial é expressa em termos de unidades de pirogalol. Por definição uma unidade de pirogalol corresponde a formação de 1,0 mg de purpurogalina em 20 segundos, no pH 6,0 a 20 °C, entretanto, isto não é um padrão e outras definições de atividade por pirogalol podem ser utilizadas. Unidades de ABTS também são comumente utilizadas. Por definição, uma unidade de ABTS corresponde a oxidação de 1 μmole de ABTS/minuto à 25 °C e pH 5,0. Os valores de atividade baseadas em unidades de ABTS são cerca de quatro vezes maiores do que as unidades de pirogalol. As reações de oxidação do pirogalol e do ABTS podem ser observadas na Figura 5.

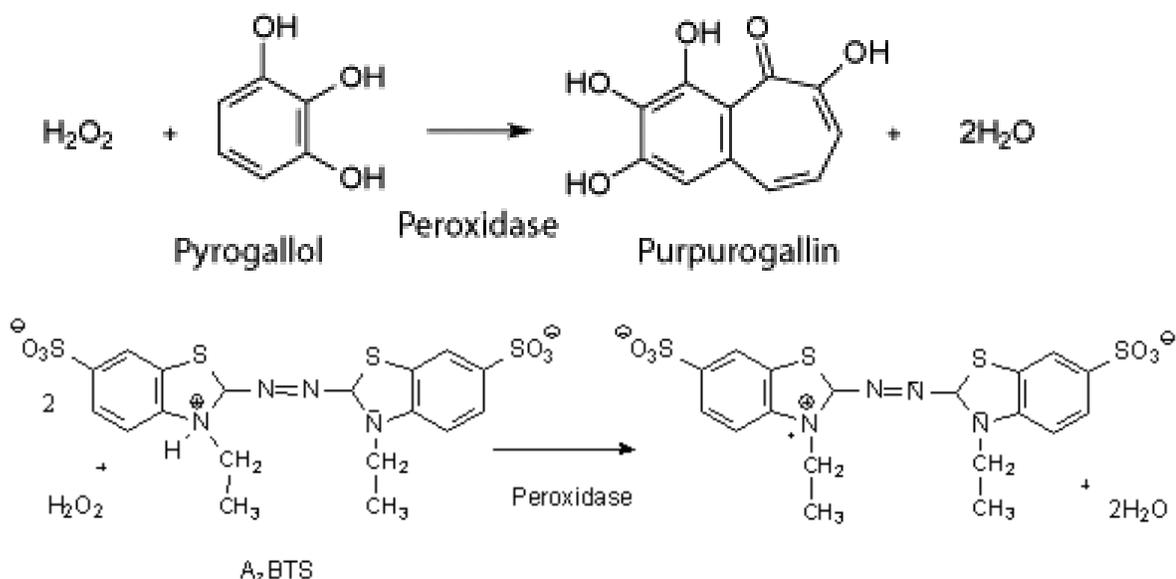


Figura 6 – Representação das reações de oxidação do pirogalol e ABTS catalisadas por peroxidase.

Apesar dos produtos serem diferentes, o mecanismo de oxidação é o mesmo. Uma grande variedade de substratos pode ser empregada neste processo o que representa mais um ponto favorável ao uso da HRP em ensaios imunoenzimáticos.

1.5.3 - 3,3', 5,5' Tetrametilbenzidina (TMB)

O composto orgânico 3,3',5,5'tetrametilbenzidina (TMB) é um dos diversos compostos aromáticos passíveis de oxidação catalisada por HRP. O TMB é uma amina aromática (Figura 7) muito utilizada como substrato para gerar sinal detectável no teste de ELISA. A reação entre o substrato TMB e peroxidase, tipicamente peroxidase (HRP), produz uma mudança de cor mensurável que se correlaciona com o nível do analito. No caso dos *Kits* para diagnósticos distribuídos por Bio-Manguinhos o substrato para revelação (cromógeno) é o 3,3',5,5'tetrametilbenzidina (TMB) (JOSEPHY et al, 1982).

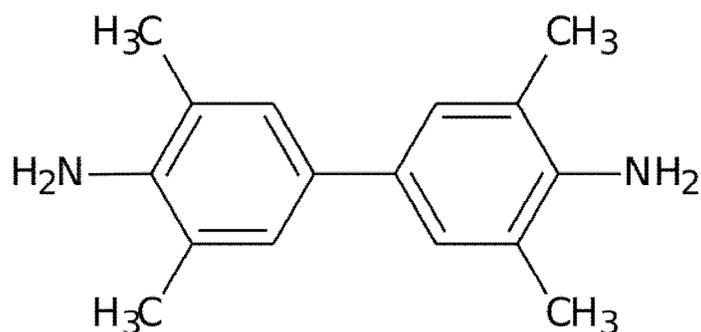


Figura 7 – Estrutura da 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina.

1.5.4 - Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), também conhecido como água oxigenada, foi isolado pela primeira vez em 1818 por Louis Jacques Thénard pela reação de peróxido de bário com ácido nítrico (THÉNARD, 1818). O processo de Thénard foi utilizado a partir do final do século 19 até meados do século 20, a partir de então vários outros processos foram desenvolvidos. O peróxido de hidrogênio é um dos oxidantes mais versáteis que existe, superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio. Através de catálise, o H_2O_2 pode ser convertido em radical hidroxila (OH) com reatividade inferior apenas ao flúor.

A água oxigenada tem ampla aplicação, que vai desde uso industrial, como no caso do branqueamento de papel, ao uso em cosméticos para clareamento de dentes. Os organismos vivos produzem peróxido de hidrogênio naturalmente, como sub-produto do metabolismo oxidativo, como agente de oxidação para formação de lignina (plantas) ou como um sinal para o sistema imunológico, conforme descrito recentemente por Niethammer (NIETHAMMER et al, 2009). Nos processos biológicos, enzimas denominadas Peroxidases catalizam a degradação do peróxido de hidrogênio liberando o poder oxidante. No caso dos ensaios imunoenzimáticos o peróxido de hidrogênio ativa a enzima, levando-a a um estado excitado que é capaz de oxidar o substrato, restaurando a enzima no processo. Geralmente estas enzimas são classificadas como oxidases dependentes de peróxido de hidrogênio e cineticamente funcionam como se apresentassem dois substratos, o composto a ser oxidado e a água oxigenada. (NIETHAMMER et al, 2009)

1.6 - Produção de conjugados com peroxidase na Seção de Insumos, Conjugados e Apoio (SEICA) de Bio-Manguinhos

1.6.1 - Obtenção de soro anti-humano e imunização de animais

As imunoglobulinas anti-humano e anticão são obtidas a partir de soros hiperimunes de cabra. As cabras são imunizadas com anticorpos do tipo IgG humana e canina. Imunizações de reforço e sangrias periódicas são realizadas nos animais, utilizando-se os anticorpos com o adjuvante de Freund (HERMANSON, 1996)

1.6.2 - Titulação de soros para teste da resposta imune de animais

Os testes de imunodifusão radial em gel de agarose tem como objetivo quantificar a resposta imune no soro da cabra são feitos mensalmente, onde se obtém o título mínimo de 1:32 frente a IgG humana conforme padronizado na Seção de Insumos Conjugados e Apoio do Departamento de Reativos para Diagnóstico (OUCHTERLONY, 1968).

1.6.3 - Precipitação por sulfato de amônio e cromatografia

O soro hiperimune de cabra passa por precipitações utilizando-se a técnica precipitação por sulfato de amônio para retirada de albumina, posteriormente, são realizadas sucessivas diálises para, em seguida, ser purificado em cromatografia líquida para obtenção dos anticorpos policlonais purificados. Após este processo, testes qualitativos e quantitativos como imunoelektroforese e dosagem de proteínas são realizados para determinar a concentração para o processo de conjugação (AHMED, 2005)

1.6.4 - Conjugação à peroxidase e titulação do conjugado

Neste processo, o meta-periodato oxida hidroxilas vicinais da porção polissacarídica da peroxidase, formando grupos aldeídos passíveis de reação com os grupamentos amino livres das imunoglobulinas. Esta metodologia de ligação produz um conjugado muito estável, desde que todos os grupos aldeído que não reagiram sejam completamente eliminados do conjugado pela reação de redução com borohidreto de sódio (Nakane e Kawaoi, 1974). O conjugado HRP-IgG anti Ig canina e HRP-IgG anti Ig humana produzidos desta forma são distribuídos para a Seção de Bactérias e Recombinantes e Seção de Protozoários, para compor os *Kits* de EIE Chagas e EIE Leptospirose Humana.

Os testes de controles internos para a definição do título dos conjugados são realizados utilizando-se amostras previamente aprovados em controles de qualidade e frente a vários outros soros humanos negativos caracterizados.

1.6.5 - Controles de processo, envase e rotulagem

Uma alíquota do conjugado é encaminhada ao Laboratório de Controle de Reativos (LACORE) para controle de processo. Após aprovação, o lote de conjugado é envasado, rotulado e enviado para a Divisão de Produto Final de Reativos (DIPFR) para a montagem do kit. O único controle feito no conjugado é o de envase para a confirmação do volume aliquotado.

1.6.6 - Validade e Armazenamento

A validade do conjugado é de até dois anos após a fabricação, se armazenado de 2 a 8 °C.

1.7 – Justificativa

Apesar das metodologias que culminam na produção dos conjugados de HRP com Imunoglobulinas de cabra anti-Ig canina e anti-Ig humana estarem bem definidas, alguns controles de processo e de insumos não estão implementados ou precisam ser revistos. Neste sentido, atendendo a necessidade de melhorar a qualidade dos *kits* para diagnósticos, as Vices diretorias de Desenvolvimento e de Produção de Bio-Manguinhos solicitaram ao Laboratório de Macromoléculas (LAMAM), Setor de Insumos e Conjugados (SEICA) e Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) um projeto para reavaliar os processos de produção, controle e armazenamento de insumos e *Kits* para diagnóstico. Dentre os insumos a serem avaliados, a peroxidase utilizada na produção de conjugados representa um alvo primordial que precisa de um controle mais efetivo, uma vez que a homogeneidade e a atividade biológica desta enzima afeta diretamente na qualidade do conjugado, e por sua vez, do Kit produzido.

2 – OBJETIVO

2.1 - Geral

□□□□□□□□ Propor metodologias para controle de matéria prima e de processo na fabricação de conjugados de peroxidase de raiz forte com imunoglobulinas.

2.2 - Específicos

- Quantificação de 3,3',5,5'Tetrametilbenzidina (TMB) por espectrofotometria.
- Quantificação de água oxigenada (H₂O₂) por espectrofotometria.
- Dosagem de atividade enzimática de peroxidase de raiz forte utilizando o pirogalol como substrato.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Quantificação de 3,3',5,5'Tetrametilbenzidina

Para a análise, utilizou-se a informação descritas por Marquez e Dunford (1997) e Josephy et al (1982), a respeito do coeficiente de absorvância molar (ϵ) do TMB, cujo valor é de $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, no comprimento de onda de 285 nm.

Para a determinação da concentração molar do TMB nas soluções analisadas, utilizou-se a fórmula:

$$[\text{TMB}] = (A_{285 \text{ nm}} / \epsilon_{\text{TMB}}) \times fd$$

Onde:

$A_{285 \text{ nm}}$ é o valor da absorvância da solução de TMB, na faixa de 0,1 a 0,7, diluída 2000 vezes, a 285 nm;

fd é o fator de diluição da solução de TMB (igual a 2000) e

ϵ_{TMB} é o valor do coeficiente de absorvância molar do TMB (igual a $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Para a determinação da concentração percentual de TMB nas soluções analisadas, utilizou-se o valor da massa molecular do TMB: 240,3 g/mol.

As amostras descritas abaixo foram produzidas no SESOD (Seção de Soluções e Diluentes e seriam destinadas a diferentes lotes de *Kits* de ELISA para Leishmaniose humana, Leishmaniose Canina e Doença de Chagas. O valor de concentração nominal de 1% refere-se ao valor de TMB pesado para o preparo da solução final.

Solução de TMB a 1% p/v (PRM: 546)

Solução de TMB a 1% p/v (PRM: 1378)

Solução de TMB a 1% p/v (PRM: 1470)

Solução de TMB a 1% p/v (Lote: 087CM017Z)

Solução de TMB a 1% p/v (Lote: 087CM018Z)

Solução de TMB a 1% p/v (Lote: 087CM019Z)

Solução de TMB a 1% p/v (Lote: 087CM020Z)

Solução de TMB a 1% p/v (Lote: 087CM022Z)

Solução de TMB a 1% p/v (Lote: 087CM023Z)

Solução de TMB a 1% p/v (Lote: 087CM024Z)

Solução de TMB a 1% p/v (Lote: 087CM025Z)

As amostras foram diluídas 2000 vezes em DMSO de modo que as leituras de absorvância ficassem entre 0,1 e 0,7 (Sigma; lote: 056K0173; PRM: 1388/2007).

Inicialmente, foram preparadas soluções de cada amostra, na diluição 1:10. Um volume de 5µL de cada uma das amostras foi acrescido de 45µL de DMSO. Em seguida à homogeneização, uma nova solução foi preparada, a partir desta solução 1:10. Para isso, 5µL de cada uma das diluições das amostras foi adicionado à 995µL de DMSO. Após homogeneização, esta solução foi analisada em espectrofotômetro, pela determinação da absorvância a 285 nm.

3.2 - Determinação da Concentração de H₂O₂.

A concentração do peróxido de hidrogênio foi estimada pela leitura da absorvância à 245 nm. Para o cálculo da concentração utilizou-se o coeficiente de extinção molar da H₂O₂ descrito por Marquez & Dunford (1997).

Para uma melhor estimativa as amostras de H₂O₂ foram diluídas de modo que as leituras de absorvância ficassem entre 0,100 e 0,500.

A seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Concentração de H}_2\text{O}_2\% = \frac{\text{Abs}_{245\text{nm}} \times \text{PM H}_2\text{O}_2 \times F \times 0,1}{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{ M}}$$

onde:

PM H₂O₂ = 34,0g

F = fator de diluição

$\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{ M}$ = coeficiente de extinção molar = 39,4 M⁻¹.C⁻¹

Os resultados obtidos foram comparados com os resultados fornecidos pelo LAFIQ após titulação da H₂O₂.

3.3 - Determinação da Atividade Enzimática.

A atividade enzimática foi estimada utilizando-se o pirogalol como substrato, conforme descrito por Chance et Maehly (1955). Foram utilizadas as condições reacionais descritas pelo fornecedor da enzima para efeito de comparação da atividade enzimática do insumo recebido.

Os reagentes foram colocados em uma cubeta de 3 mL de acordo com a tabela 3. Em seguida a mistura reacional foi homogeneizada até que a absorvância à 420 nm ficasse constante.

Em seguida adicionou-se 0,1 mL da enzima ou do tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (branco reacional) e foram feitas leituras periódicas da absorvância à 420 nm por cinco minutos.

O cálculo da atividade foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{(\Delta\text{Abs}_{420\text{nm}} - \Delta\text{Abs}_{420\text{nm}} \text{ Branco}) \times 3 \times \text{F. Dil}}{12 \times 0,1}$$

Onde:

$\Delta\text{Abs}_{420\text{nm}}$ = leitura obtida

3 = volume total do ensaio – 3 mL

F. dil = fator de diluição da enzima

12 = coeficiente de extinção (mg/mL) da purpurogalina

0,1 = volume da enzima em mL

A atividade também pode ser expressa em termos de unidade/mg de sólido ou por unidade/mg de proteína, para tanto basta dividir a atividade obtida pela concentração em mg/ml ou pela concentração de proteína como apresentado abaixo.

$$\text{Ativ. Específica} = \frac{\text{Atividade (U/mL)}}{\text{Conc. Proteína (mg de ptn/mL)}}$$

$$\text{Ativ. /mg sólido} = \frac{\text{Atividade (U/mL)}}{\text{Conc. sólido (mg/mL)}}$$

As enzimas da Sigma e da Applichem foram diluídas 600 vezes para atender requisitos de velocidade inicial de reação (concentração de substrato muito maior do que da enzima).

4 - RESULTADOS

Para a verificação da concentração de TMB foram testadas 11 amostras de TMB produzidas em Bio-Manguinhos. Os resultados foram sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado da quantificação dos lotes de TMB produzidos no SESOD por espectrofotometria no UV. O desvio padrão foi calculado em função das médias dos resultados de concentração %, considerando que de cada lote foram retiradas cinco alíquotas para dosagem (Anexo III - Tabela detalhada).

Amostra	Absorvância média	[TMB] média (mM)	Conc. % Média	Desvio Padrão
546	0,50	48,00	1,15	0,09
1378	0,36	34,20	0,82	0,03
1470	0,57	54,60	1,31	0,01
087CM017Z	0,05	4,60	0,12	0,03
087CM018Z	0,60	57,00	1,37	0,03
087CM019Z	0,56	52,40	1,26	0,01
087CM020Z	0,57	53,20	1,28	0,01
087CM022Z	0,06	4,80	0,11	0,01
087CM023Z	0,55	52,20	1,25	0,03
087CM024Z	0,04	4,20	0,10	0,01
087CM025Z	0,55	52,20	1,25	0,02

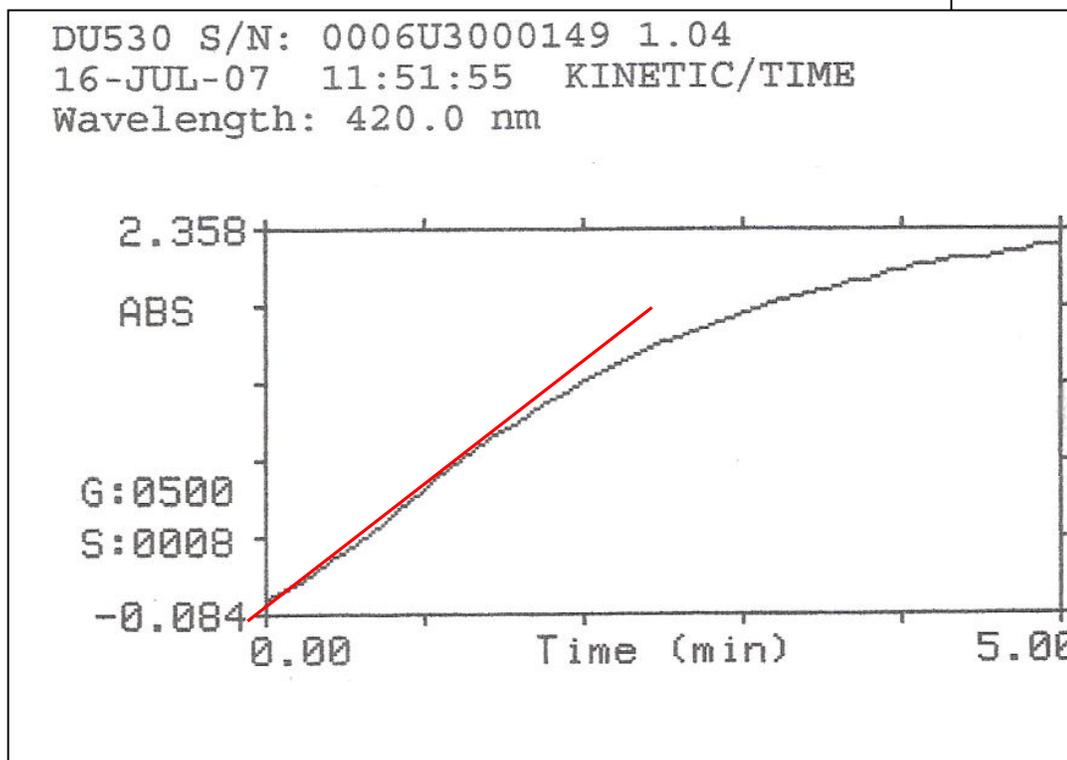
As amostras de água oxigenada produzidas na Seção de Soluções e Diluentes (SESOD) foram quantificadas no Laboratório Físico-Químico (LAFIQ) por titulação utilizando-se permanganato de potássio como padrão e apresentou concentração média estimada em torno de 1,19%. O resultado de análise da água oxigenada produzida em Bio-Manguinhos e destinada aos *Kits* de EIE foi entregue após cinco dias da data de entrega da amostra para análise. Em paralelo a análise do LAFIQ, os mesmos Lotes de água oxigenada foram analisados por espectrofotometria em luz Ultra Violeta, e a concentração média do peróxido de hidrogênio obtido foi de 1,16%.

Nos ensaios de determinação de atividade biológica com pirogalol foram avaliadas duas marcas de enzimas HRP diferentes, uma do fabricante Sigma e outra do fabricante Applichem. Os valores de atividade biológica podem ser observados na tabela 3. A curva cinética de oxidação do pirogalol foi acompanhada pela leitura de absorvância à 420nm conforme pode ser observado na Figura 8A. A Figura 8B corresponde ao branco de reação, ou seja, a mistura reacional sem a enzima peroxidase. Os cálculos de atividade foram realizados conforme descrito na seção de Materiais e Métodos.

Tabela 3 – Resultado da determinação de atividade enzimática de HRP com o pirogalol como substrato. Os números de 1 a 3 ao lado do nome da amostra servem apenas para indicar que foi preparada uma mesma amostra da enzima em diferentes momentos.

Amostra	Atividade nominal (U/mg de sólido)	Atividade encontrada (U/mg de sólido)	Percentual de atividade recuperada
HRP Sigma -1	298 U/mg	263 U/mg	88,3%
HRP Sigma -2	298 U/mg	266 U/mg	89,3%
HRP Sigma-3	298 U/mg	259 U/mg	86,9%
HRP Applichem-1	260U/mg	237 U/mg	91,3
HRP Applichem-2	260U/mg	221 U/mg	85,0%
HRP Applichem-3	260U/mg	225 U/mg	86,5%

FIGURA 8A



DU530 S/N: 0006U3000149 1.04
 16-JUL-07 11:42:52 KINETIC/TIME
 Wavelength: 420.0 nm

FIGURA 8B

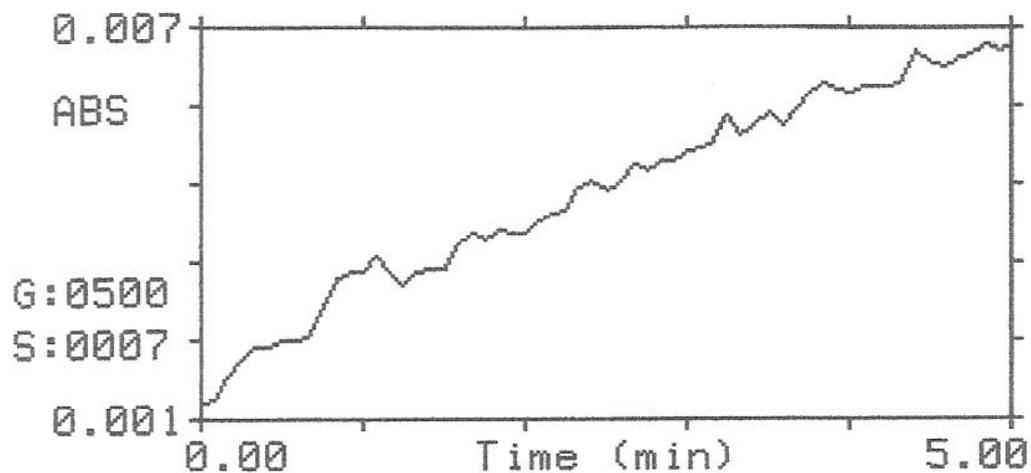


Figura 8 - A) Cinética de oxidação do pirogalol pela água oxigenada na presença da enzima HRP. A reta vermelha corresponde à tangente da curva cinética. B) Degradação do pirogalol na ausência do catalisador enzimático (B).

5 - DISCUSSÃO

A espectroscopia UV-VIS é uma metodologia que relaciona a medida da absorção de radiação eletromagnética de uma substância em um determinado comprimento de onda e a concentração desta substância em solução. Esta relação é descrita pela lei de *Lambert-Beer* representada pela equação:

$$A = \alpha lc$$

Onde: **A** é a absorvância; α é coeficiente de absorção, também conhecido por coeficiente de extinção ou absortividade; **l** é a distância que a luz atravessa, também chamado de caminho ótico (geralmente 1cm); **c** é a concentração da amostra.

De uma forma resumida, a lei Lambert-Beer explica que há uma relação direta entre a absorção de luz através de uma substância e a concentração da substância, assim como também entre a transmissão e a longitude do corpo que a luz atravessa. Se os parâmetros **l** e α são definidos, a concentração da substância pode ser deduzida a partir da quantidade de luz absorvida. A relação da lei de *Lambert-Beer* entre concentração e absorção de luz é a base do uso de espectroscopia para determinar a concentração de substâncias em química analítica, deste modo a absorvância pode ser utilizada de forma eficiente quando se trata de substância homogêneas como os insumos TMB e H₂O₂. O único problema relacionado com esta abordagem para quantificação, além da necessidade da amostra ser homogênea, é que a lei de *Lambert-Beer* tende a não ser válida para concentrações muito elevadas. Nestes casos a relação de absorvância / concentração de amostra não é linear e tende para um limite que corresponde a máxima leitura do espectrofotômetro. Como consequência, o erro associado a leitura de absorvâncias acima da região de linearidade é muito alto. Para evitar este problema, por meio de diluições seriadas, utiliza-se absorvâncias da ordem de 0,1 a 0,7 unidades de absorvância para o TMB e de 0,1 a 0,5 unidades de absorvância para a H₂O₂.

A metodologia de espectroscopia no UV-VIS foi então selecionada para a avaliação das concentrações de TMB e água oxigenada em função da praticidade (baixo custo e rápida) e porque não haveria a necessidade de montar curva padrão, uma vez que estes insumos possuem seus coeficientes de extinção bem definidos e são comercializados em formas com alta homogeneidade.

O processamento do TMB é relativamente simples, a primeira vista, e consiste na dissolução do TMB em DMSO. Embora o processo não seja complicado, o único controle relativo ao TMB é o controle de envase, no qual é verificado apenas o volume de TMB nos frascos a serem distribuídos por Bio-Manguinhos. Este controle por si só não basta e problemas como o observado em todos os lotes avaliados nesta dissertação ocorrem com certa frequência. As avaliações dos diferentes lotes de TMB apresentadas na tabela 2 evidenciam as variações de concentração lote a lote. Em especial, no caso dos lotes 087CM017Z, 087CM022Z e 087CM024Z as concentrações encontradas foram 10 vezes menores do que o esperado.

No caso da água oxigenada, o controle da concentração é realizado por titulação no Laboratório de Físico-Químico (LAFIQ) de Bio-Manguinhos. A titulação é uma técnica analítica, que tem como finalidade determinar a concentração exata de uma solução, entretanto, em termos de precisão e acurácia depende muito do técnico que realiza o ensaio e da qualidade do padrão primário. No caso da dosagem de peróxido de hidrogênio, utiliza-se uma solução de concentração definida de permanganato como padrão primário. A concentração do peróxido é determinada no ponto de viragem, quando todo o permanganato do titulante é consumido e ocorre a mudança de coloração da solução de roxo/vinho para incolor. Comparando-se os resultados obtidos por titulação (LAFIQ) e pela leitura de absorvância observa-se que a diferença entre os valores de concentração observados pelas metodologias utilizadas foi de 2,5%, ou seja, se a titulação representa o valor real o erro observado entre as duas metodologias é menor do que 5% o que é perfeitamente aceitável. Outro ponto favorável para o uso da espectroscopia é o tempo que o LAFIQ tarda na entrega do resultado de quantificação da água oxigenada produzida para os *Kits*. Atualmente este processo leva de 3 a 5 dias, pois não é um ensaio rotineiro e depende da disponibilidade e preparo do padrão primário, além da possibilidade de execução da titulação em meio a rotina de trabalho do laboratório.

O último insumo avaliado nesta dissertação foi a enzima HRP. Atualmente o controle desta enzima é feito apenas por inspeção visual, e é negligenciado o fato dela apresentar atividade biológica, e que esta característica é fundamental para o teste imunoenzimático. Ambas as enzimas avaliadas apresentaram valores de atividade biológica menores do que o valor

fornecido pelo fabricante conforme observado na Tabela 3. A perda parcial de atividade não é inesperada, mas lotes de enzimas com valores muito baixos de atividade (menor do que 50% da atividade descrita pelo fabricante) devem ser descartados, pois resultariam em conjugados sem atividade enzimática. Neste sentido, o ensaio com pirogalol deve ser empregado como método de qualificação de insumo. No anexo I está representado o fluxograma de montagem dos *kits* para EIE, os respectivos controles podem ser observados em azul. Após a montagem, amostras aleatórias dos *kits* são conduzidas ao Controle de Qualidade para avaliação final do produto sob a forma de um pré-Kit. Os lotes produzidos são confrontados com lotes de *kits* aceitos e um painel de soros positivos e negativos para a patologia em questão. Quando a avaliação do lote produzido não está em conformidade com o padrão o lote todo é submetido a repadronização, ou seja, ajuste do título do conjugado ou da substituição do antígeno. O lote de pré-*kit* é reavaliado, caso seja aprovado o lote final é preparado e novamente submetido ao Controle de Qualidade, desta vez como Controle do Kit. No caso de reprovação todos os itens do lote são descartados sem a definição de qual insumo está não conforme.

6 - CONCLUSÃO

A falta de padronização e/ou do controle da concentração de TMB influencia diretamente na reprovação de *Kits* produzidos ou na necessidade de ajuste dos *kits* para aprovação. Estes dois cenários podem ser descritos da seguinte forma:

- Baixas concentrações do cromógeno, como nos lotes 087CM017Z, 087CM022Z e 087CM024Z, resultam em valores de absorvância dos controles positivos no ELISA baixos ou próximos a zero. Como consequência, o Controle da Qualidade do Instituto determinaria a reprovação dos *Kits*, uma vez que o Controle não avalia o TMB produzido (controle de processo) e o TMB distribuído no kit (controle final de produto – Kit). Neste caso todo o material que compõe o kit não seria aproveitado, representando um grande desperdício de recursos financeiros, material, de pessoal e de tempo. Por outro lado, concentrações como a do lote 1378 resulta em uma coloração do poço menor do que a observada no caso de concentrações de 1% para o TMB e consequentemente recebem indicação para diminuição do título do conjugado no controle de processo final (Vide anexo I).

- Concentrações muito altas de TMB conduzem a um outro problema, o aumento da cor de fundo, desta forma, o sinal do branco (ponto sem aplicação de amostra apenas para avaliação da cor de fundo dos reagentes) e dos padrões negativos ficariam altos. Neste caso, se o Kit ainda está em controle de processo, a indicação do Controle para o ELISA é o reajuste do conjugado ou do antígeno. De qualquer modo a repadronização de um conjugado demanda tempo e mais gastos com insumos que podem ser evitados com uma simples diluição do cromógeno.

Na quantificação por espectrofotometria os problemas relativos ao preparo de reagentes seriam eliminados e o ensaio em si é rápido, sendo apenas necessário diluição da amostra para que os resultados de leitura de absorvância fiquem dentro do intervalo de 0,1 a 0,5 para a H_2O_2 e 0,1 a 0,7 para o TMB. Valores de absorvância acima deste limite não apresentam uma relação quantidade/absorvância linear. Os baixos valores de desvio padrão observados nos resultados de quantificação de TMB sugerem uma boa precisão do método mesmo para as amostras mais diluídas e valida este ensaio.

O ensaio enzimático com pirogalol mostrou-se bem simples desde que respeitado a diluição da enzima. A curva cinética de degradação do pirogalol pode ser observada na Figura 8. A variação da absorvância no branco da reação, aproximadamente 0,006 unidades de absorvância (Figura 8B) mostra que uma pequena quantidade de pirogalol é degradada na ausência da enzima, mas tal variação pode ser desconsiderada se levarmos em conta a variação total do ensaio com a enzima (Figura 8A). Após a adição da enzima (Figura 8A), o pirogalol é consumido rapidamente, entretanto em função da diluição da enzima conseguimos garantir que até 1 minuto de reação o consumo de substrato é linear e respeita as condições de velocidade inicial de reação (concentração de enzima muito menor do que a concentração de substrato e baixa concentração do produto – vide Figura 8A, reta tangente). Concentrações maiores de enzima refletiria no consumo mais rápido do substrato e, portanto uma diferente curva cinética, em outras palavras a reta tangente da curva cinética teria um ângulo de inclinação maior, dificultando na medida da atividade enzimática. Este ensaio pode até mesmo ser utilizado para a caracterização do conjugado final, o que daria mais consistência e qualidade aos *Kits* de EIE de Bio-Manguinhos. Outra sugestão para o controle do conjugado é a utilização da imunodifusão para a determinação do título final do conjugado (vide anexo II). De posse da atividade enzimática, do título e da relação enzima/anticorpo o conjugado fica caracterizado e qualquer problema no kit pode ser facilmente determinado pelo Controle de Qualidade.

A proposta desta monografia, sumarizada, no fluxograma do anexo II, pode contribuir de sobremaneira no aumento da qualidade do produto final e conseqüentemente, na diminuição das reprovações de lotes pelo Controle da Qualidade, contribuindo para a diminuição do tempo de processamento total, do custo do processo e evitando retrabalho em função de ajustes de concentração de conjugado ou antígeno.

7- REFERÊNCIAS

AHMED H., Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization; 227-228, 2005.

BIO-MANGUINHOS - Reativos. O que são? [on line] Rio de Janeiro, BRASIL; 2009 [Capturado 20 de Dezembro de 2009] Disponível em: <http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=185>.

BIO-MANGUINHOS – História [on line] Rio de Janeiro, BRASIL; 2009 [Capturado 20 de Dezembro de 2009] Disponível em: <http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=185>.

BIO-MANGUINHOS – Bula de IFI para Leishmaniose humana. http://www.fiocruz.br/bio/media/bulas/reativos/BM_007_06Bk_IFIleish_hu_m.pdf

BORNENS, M., PAINTRAND, M., and Celati, C. The Cortical Microfilament System of Lymphoblasts Displays a Periodic Oscillatory Activity in the Absence of Microtubules: Implications for Cell Polarity **The Journal of Cell Biology**, 109, 1071-1083, 1989.

CHANCE, B. and Maehly, A.C. **Methods in Enzymology**, II, 773-775, 1955.

DELINCEE, H and Radola, B.J., Fractionation of Horseradish Peroxidase by Preparative Isoelectric Focusing, Gel Chromatography and Ion-Exchange Chromatography **Eur. J. Biochemistry**, 52, 321–330, 1975.

DESHPANDE, S.S. Enzyme Immunoassays, From **Concept to Product Development**, Chapman and Hall, 169–171, 1996.

HARLOW, E. and Lane, D., Antibodies A Laboratory Manual, **Cold Spring Harbor Laboratory**, 346–348, 1988.

HERMANSON G. T. **Bioconjugate Techniques**, In: Academic press 1ª ed.; chap. 8. p. 297-364, 1996.

IWEALA OI., HIV Diagnostic tests: An overview **Contraception**; 70: 141-147, 2004.

JOSEPHY, P.D.; Eling, T. and Manson, R.P. The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine. Free Radical and Charge-Transfer complex intermediates. **The Journal of Biological Chemistry**, 257 (7) : 3669-75, 1982.

MACCRINDLE, C.; Schwenzer, K.; Jolley, M.E. Particle Concentration Fluorescence Immunoassay: A new immunoassay technique for quantification of human immunoglobulins in serum. **Clin.Chem.** 31(9): 1487-90, 1985.

MARQUEZ, L.A. and Dunford, B. H. Mechanism of the Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine by Myeloperoxidase Determined by Transient - and Steady-State Kinetics. **Biochemistry**, 36: 9349-55, 1997.

NAKANE, P.K.; Kawaoi, A. Peroxidase-labeled antibody: a new method of conjugation. **J Histochem Cytochem**; 22:1084-91, 1974.

NUNES G.S. Métodos imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectiva. **Química Nova**. V.28 (3), p. 462-271; 2005.

NIETHAMMER, P; Clemens G. A., Thomas L.; Mitchison, T.J. "A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish". **Nature** 459 (7249): 996-999, 2009.

OUCHTERLONY, O. Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Michigan: **Ann Arbor Science Publishers**, Ann Arbor p.215, 1968.

OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. **Prog. Allergy**; 5; 1-2, 1958.

ROQUE, A.C.A.; Silva, C.S.O; Taipa, M.A. Affinity – based methodologies and ligands for antibody purification: advances and perspectives. **Journal of Chromatography A**. 1160, p. 44-55; 2007.

SANTOS, N.S.O. / Santos, N. ; Romanos, M. T. V. ; Wigg, M. D. Diagnóstico Laboratorial das Viroses In: Introdução à Virologia Humana. 1. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2002. v. 1. 254 p.)

SCHOMBERG, D.; Salzmann, M. and Stephan, D. **Enzyme Handbook 7**, EC 1.11.1.7:1–6, 1993.

SHANNON L.M.; Kay, E. and Lew, J.Y. Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots: I. ISOLATION AND PHYSICAL PROPERTIES. **The J. of Biol. Chem.**, 241, 2166-2172, 1966.

SHUTZ, A.J.; Winklmaier, M.; Weller, M.G.; Niessner, R. Stabilization of Horseradish Peroxidase (HRP) for the Use in Immunochemical Sensors. **SPIE: Intl Soc Opt Eng** [serial online] 3105:332-40, 1997.

STRICKLAND E.H.; Kay E.; Shannon L. M. and Horwitz J. Peroxidase Isoenzymes from Horseradish Roots: III. Circular Dicroism of Isoenzymes and Apoisoenzymes. **The J. of Biol Chem** Vol. 243, No. 13, Issue of July 10, pp. 3560-3565, 1968.

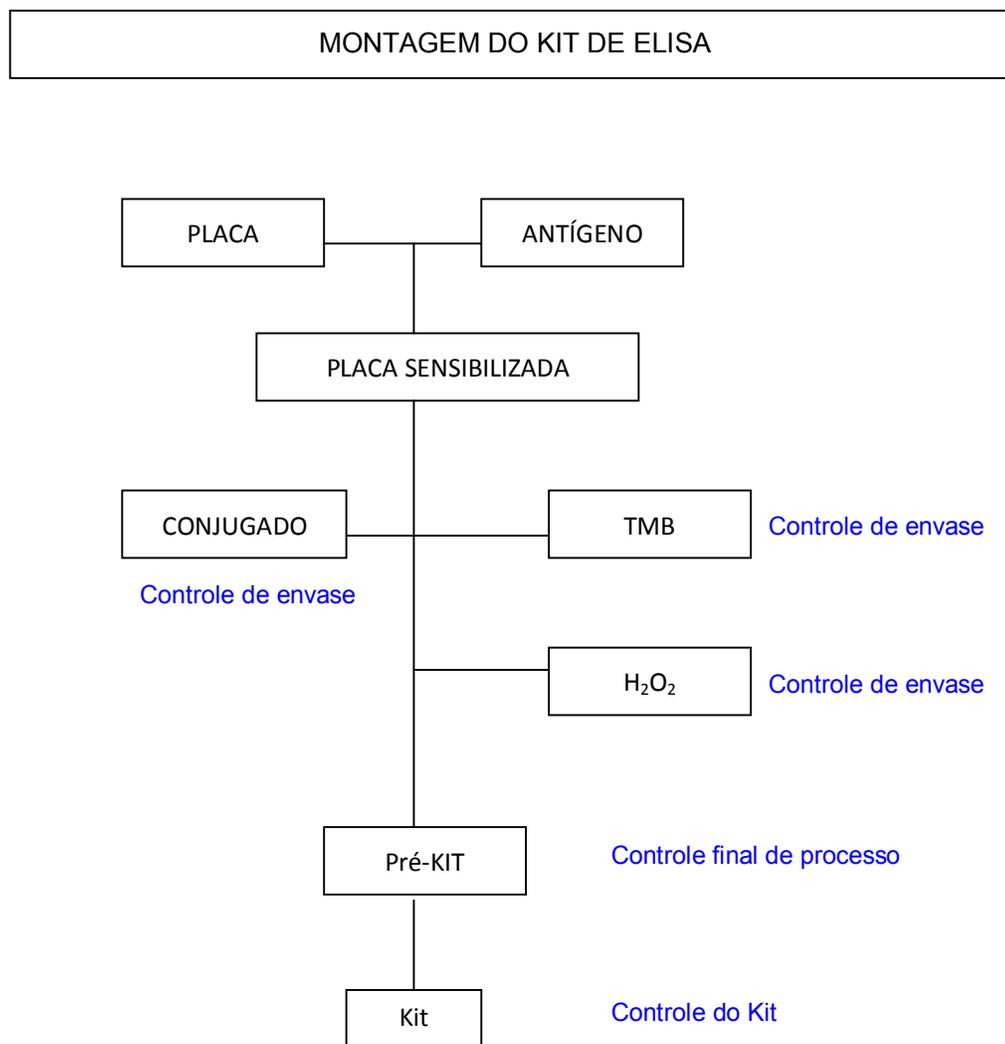
THÉNARD, L.J. **Annales de Chimie et de Physique** 8: 308, 1818.

UGAROVA, N.N., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 570, 31–42, 1979.

ZOLLNER, H., **Handbook of Enzyme Inhibitors**, 2nd Ed., Part A: 367–368, 1993.

MEDEIROS, M.Z. **Reagentes para Diagnóstico: Estratégias para a Produção e Desenvolvimento em Bio-Manguinhos**. Mestrado Profissional (Dissertação em Gestão de C&T em Saúde) – Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rio de Janeiro, 2004.

Anexo I – Fluxograma de montagem dos *Kits* de Elisa do DEREDE e seus pontos de controle (em azul).



Anexo II – Fluxograma de montagem dos *Kits* de Elisa do DERED, seus pontos de controle e os controles de processo sugeridos (em vermelho).



Anexo III – Tabela detalhada quantificação dos lotes de TMB produzidos no SESOD por espectrofotometria no UV.

Amostra	Absorvância (285nm)	[TMB] (mM)	[TMB] média (mM)	Conc %	Conc. % Média	Desvio Padrão
546	0,535	51	48	1,22	1,15	0,093
	0,528	50		1,2		
	0,535	51		1,22		
	0,478	46		1,1		
	0,442	42		1,01		
1378	0,373	36	34,2	0,87	0,82	0,034
	0,365	35		0,84		
	0,358	34		0,82		
	0,346	33		0,79		
	0,346	33		0,79		
1470	0,569	54	54,6	1,3	1,31	0,011
	0,574	55		1,32		
	0,574	55		1,32		
	0,573	55		1,32		
	0,568	54		1,3		
087CM017Z	0,055	5	4,6	0,12	0,12	0,027
	0,051	4,8		0,16		
	0,044	4,2		0,1		
	0,052	4,9		0,12		
	0,041	3,9		0,09		
087CM018Z	0,613	58	57	1,39	1,37	0,032
	0,588	56		1,35		
	0,577	55		1,32		
	0,608	58		1,39		
	0,609	58		1,39		
087CM019Z	0,558	53	52,4	1,27	1,26	0,011
	0,548	52		1,25		
	0,546	52		1,25		
	0,546	52		1,25		
	0,554	53		1,27		
087CM020Z	0,57	54	53,2	1,3	1,28	0,013
	0,56	53		1,27		
	0,562	53		1,27		
	0,552	53		1,27		
	0,552	53		1,27		

Amostra	Absorvância (285nm)	[TMB] (mM)	[TMB] média (mM)	Conc %	Conc. % Média	Desvio Padrão
087CM022Z	0,055	5,2	4,8	0,12	0,11	0,011
	0,053	5		0,12		
	0,046	4,3		0,1		
	0,045	4,3		0,1		
	0,052	5,2		0,12		
087CM023Z	0,552	53	52,2	1,27	1,25	0,030
	0,551	52		1,25		
	0,552	53		1,27		
	0,529	50		1,2		
	0,554	53		1,27		
087CM024Z	0,041	3,9	4,2	0,09	0,1	0,007
	0,044	4,2		0,1		
	0,047	4,5		0,11		
	0,045	4,3		0,1		
	0,045	4,3		0,1		
087CM025Z	0,552	53	52,2	1,27	1,25	0,017
	0,543	52		1,25		
	0,546	52		1,25		
	0,536	51		1,23		
	0,553	53		1,27		