

(11) Número de Publicação: **PT 1952154 E**

(51) Classificação Internacional:
G01N 33/543 (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.11.24	(73) Titular(es): GENTIAN AS	
(30) Prioridade(s): 2005.11.24 NO 20055561 2005.11.28 NO 20055603 2006.05.19 NO 20062288	KOLSRODVEIEN 120 1599 MOSS	NO
(43) Data de publicação do pedido: 2008.08.06	(72) Inventor(es): KATHRIN SUNDE TOM NILSEN	NO NO
(45) Data e BPI da concessão: 2010.05.26 166/2010	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **IMUNOENSAIO TURBIDIMÉTRICO PARA DETERMINAR A CISTATINA C HUMANA**

(57) Resumo:

RESUMO**“IMUNOENSAIO TURBIDIMÉTRICO PARA DETERMINAR A CISTATINA C HUMANA”**

Há uma procura de imunoenaios turbidimétricos aperfeiçoados para a determinação de cistatina C humana em amostras biológicas, especialmente em amostras clínicas de fluidos corporais humanos. A presente invenção proporciona um processo de imunoenasiao turbidimétrico e um conjunto de reagentes que permitem medir a cistatina C humana pelo método turbidimétrico, daí resultando um sinal turbidimétrico surpreendentemente mais intenso e mais rápido do que os do presente estado da técnica. O sinal mais intenso e mais rápido é conseguido graças à utilização de novos reagentes e composições e permite tempos de ensaio mais curtos e leituras cinéticas com um sinal mais intenso, melhorando a velocidade e a qualidade gerais dos ensaios. Consegue-se obter uma melhor consistência relativamente à interferência com lípidos e uma melhor linearidade.

DESCRIÇÃO

"IMUNOENSAIO TURBIDIMÉTRICO PARA DETERMINAR A CISTATINA C HUMANA"

A presente invenção diz respeito a um imunoensaio turbidimétrico aperfeiçoado para avaliar a cistatina C humana numa amostra de um líquido corporal humano, recorrendo à utilização de conjugados específicos de nanopartículas-anticorpos, a um processo para avaliar a taxa de filtração glomerular de um paciente, recorrendo ao referido ensaio, aos correspondentes estojos de reacção, aos conjugados aperfeiçoados de nanopartículas-anticorpos e à sua utilização para os fins médicos supramencionados.

Antecedentes da invenção

A cistatina C foi descoberta e caracterizada em 1981 por A. Grubb e H. Lovberg [Grubb AO, *et al*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982; 79]. A cistatina C foi a primeira proteína descoberta do que viria a ser designado posteriormente por superfamília de proteínas cistatinas. A superfamília de proteínas cistatinas é um grupo de proteínas que inibem as enzimas proteases das cisteína. Presentemente, estão a ser estudadas outras funções biológicas da cistatina C. Ao contrário de outros membros da superfamília de cistatinas, a cistatina C encontra-se presente em todos os fluidos corporais, ao passo que a composição total das diferentes cistatinas varia de fluido corporal para fluido corporal e em diferentes compartimentos [Abrahamson M, *et al*: J. Biol. Chem. 1986; 261: 11282]. Em 1990, Abrahamsson *et al*. demonstraram, que

a cistatina C é produzida com uma velocidade estável e por todas (ou quase todas) as células nucleadas no corpo humano sendo aquilo a que se chama uma proteína "household" ou constitutiva [Abrahamson M, *et al*: Biochem. J. 1990; 268:287-94].

A cistatina C - com uma massa molecular de 13 kD - é filtrada livremente através da membrana glomerular normal do rim, mas é depois reabsorvida e catabolizada nos "túbulos proximais", isto é, o compartimento dos rins que reabsorve a maior parte dos péptidos e das proteínas mais pequenas que passam através da membrana glomerular. Deste modo, os rins conservam estes materiais proteicos para o corpo e impedem perdas para a urina (Jacobsson B, *et al*: Histopathology 1995; 26:559-64). [Heyms SB, *et al*: Am. J. Clin. Nutr. 1983; 37: 478].

A creatinina, até ao momento, o marcador mais utilizado para determinação da taxa de filtração glomerular (VFG), é uma molécula de baixa massa molecular produzida nas células dos músculos. Deste modo, a taxa de formação e de secreção de creatinina está intimamente associada à massa muscular do corpo. Sabe-se que a massa muscular de um indivíduo numa população varia consideravelmente. As pessoas mais idosas têm normalmente uma massa muscular pequena comparativamente com a massa corporal e muitos doentes perdem massa muscular à medida que as suas doenças progridem. De um modo geral, as crianças têm uma massa muscular relativa diferente, comparativamente com os adultos e os homens têm em média uma massa muscular relativamente mais elevada do que as mulheres. Assim sendo, quando se utiliza a concentração de creatinina sérica como marcador para a taxa de filtração glomerular, o valor da

creatinina sérica pode estar situado dentro dos valores de referência, mesmo quando ocorre uma redução de 50% na taxa de filtração glomerular [Shemesh O, et al: Kidn. Int. 1985; 28: 830-8]. Os regimes alimentares também influenciam significativamente o nível de creatinina sérica, especialmente no caso de uma dieta rica em proteínas [Perrone RD, et al: Clin. Chem. 1992; 38: 1933-53].

As medições de creatinina no soro e no plasma não são "métodos consagrados infalíveis" para a medição da taxa de filtração glomerular. Por tal motivo, a utilização de injeções intravenosas de substâncias marcadas com radioisótopos, tais como Cr-51-EDTA ou Tc-99m-DTPA, ou injeções de agentes iodados, tais como 'iohexol', adquiriram alguma popularidade. Estes métodos são dispendiosos, morosos e são necessárias injeções - e frequentemente a colheita repetida de amostras de sangue. Na publicação "Simple Cystatin C-Based Prediction Equations for Glomerular Filtration Rate Compared with the Modification of Diet in Renal Disease Prediction Equation for Adults and the Schwartz and the Counahan-Barratt Prediction Equations for Children", por Grubb et al. em Clinical Chemistry 51:8, 1420-1431, foi demonstrado que medições simples de cistatina C no sangue permitem substituir métodos complicados de medição da taxa de filtração glomerular.

Para a medição de cistatina C foram utilizados originalmente métodos bioquímicos clássicos, mas rapidamente se passou para os imunoensaios turbidimétricas e nefelométricos. A empresa 'Dade-Behring' foi pioneira nos métodos de medição nefelométricos. Ver também Coll, E et al., Am. J. Kidney Disease 2000; 36, 2934. Os métodos

nefelométricos são bastante fiáveis. O inconveniente dos métodos nefelométricos reside no facto de os instrumentos utilizados terem uma velocidade de processamento bastante baixa comparativamente com os espectrofotómetros automáticos que têm por base a transmissão de luz. Os nefelómetros produzidos por 'Dade Behring', tipicamente o nefelómetro BNII e os nefelómetros ProSpec, e os da 'Beckman Instruments', conseguiram uma penetração significativa no mercado, mas estão muito menos generalizados do que os instrumentos que têm por base as medições de transmissão de luz. Os nefelómetros também têm uma produtividade operacional com amostras muito menor do que os grandes instrumentos automáticos que têm por base as medições de transmissão de luz.

H. Stone *et al.* no artigo "Analytical performance of a particle-enhanced nephelometric immunoassay for serum Cystatin C using rate analysis", em *Clinical Chemistry* Vol. 8, págs. 1482-85, 2001, descreveram um método nefelométrico eficaz. No entanto, os instrumentos nefelométricos têm uma capacidade limitada para um número grande de amostras e o número de instrumentos nefelométricos é limitado. Deste modo, havia uma necessidade de se passar para instrumentos homogénicos-espectrofotométricos de absorção, uma vez que tais instrumentos são mais abundantes e têm maior capacidade.

A empresa 'Dako Cytomation', Dinamarca, foi pioneira no campo dos imunoensaios turbidimétricos de cistatina C. o estado da técnica está descrito nos artigos seguintes: "Cystatin C - The marker of choice for renal function testing" por C. Schmidt em *European Clinical Laboratory*, 10 de Fevereiro de 2004. "New improved automated particle

enhanced turbidimetric immunoassay for quantitative determination of human Cystatin C in serum and plasma" por C. Schmidt, C. Kjoller e K Gronkjaer, uma apresentação obtida a partir do website da 'Dako Cytomation AS', Julho de 2005.

No entanto, as medições turbidimétricas são perturbadas pela turvação das amostras, conforme descrito no artigo "Turbidity in immunoturbidimetric assays" por Dahr *et al*, em Ann. Clin. Biochem. Vol. 27, pág. 509, 1990. No 29º congresso nórdico de química clínica, Malmo, Suécia, 24 a 27 de Abril de 2004, A. Grubb apresentou resultados sobre a interferência de triglicéridos em amostras de soro e do plasma sobre os valores de medições de cistatina C. Assim sendo, continua a ser necessário que haja aperfeiçoamentos dos imunoensaios turbidimétricos para cistatina C humana.

Uma alternativa aos sistemas homogêneos de imunoensaio seriam os sistemas não homogêneos de imunoensaios baseados na separação. A vantagem dos sistemas não homogêneos de imunoensaios caracteriza-se por um passo de separação com lavagem no decurso do ensaio. A vantagem destes sistemas consiste no facto de removerem - por meio de lavagem - todas as substâncias causadoras de interferências. Além disso, permitem a remoção dos anticorpos não ligados ou de enzimas não ligadas ou de radicais que geram fluorescência ou cor ou outros sinais. De um modo geral, estes métodos são de tipo não competitivo, uma vez que a substância que se pretende medir - doravante designada por analito - não tem de competir, com análogos marcados, pela ligação aos anticorpos. Este aspecto, e a prática dos passos de lavagem, faz com que seja possível utilizar em excesso

anticorpos imobilizados e anticorpos marcados, proporcionando uma sensibilidade elevada e, normalmente, um nível elevado de exactidão, especialmente quando são utilizados anticorpos de alta qualidade.

Há inúmeras publicações sobre sistemas de imunoensaios em fase sólida e outros sistemas de imunoensaios não homogéneos. Estão disponíveis no mercado grandes sistemas automatizados. A empresa Abbott Diagnostic Division, US, comercializa reagentes para ImX, AxSYM e para outros instrumentos automáticos de imunoensaios não homogéneos; a empresa Roche Diagnostics, Alemanha, comercializa reagentes para Elecsys e para outros sistemas de imunoensaios não homogéneos; e há muito mais fornecedores de reagentes e sistemas de imunoensaios não homogéneos. Um sistema de imunoensaios não homogéneos, que continua a ser bastante popular, é o sistema de imunoensaios designado por sistema de microtitulação. Estes sistemas são lentos, mas são fiáveis e não são dispendiosos. A literatura geral sobre imunoensaios proporciona bastante informação sobre estes sistemas que são perfeitamente conhecidos pelos especialistas na matéria.

O inconveniente dos sistemas de imunoensaios não homogéneos é a falta de capacidade para um número elevado de ensaios numa unidade de tempo, isto é, por um período de execução de uma hora. Além disso, uma vez que estão envolvidas fases sólidas, são utilizados frequentemente dispositivos especiais ou fases sólidas que têm um determinado custo de produção, mesmo quando esta é feita em massa. A elevada produtividade global e a velocidade de geração de resultados passaram a ser cada vez mais

importantes nos últimos anos devido ao número cada vez maior de ensaios que é necessário efectuar. Há a necessidade de se passar das tecnologias de imunoensaios não homogêneos, frequentemente em fase sólida, para sistemas de imunoensaios homogêneos.

Os sistemas de imunoensaios homogêneos são de construção simples e têm uma maior produtividade global. Os reagentes são misturados, incubados e medidos durante ou após a incubação. São utilizados sinais dos pontos críticos ou as diferenças de sinais entre diferentes instantes ou medições cinéticas contínuas. Os sinais podem ser as medições de fluorescência, cor ou opacidade (turbidimetria). Em particular, os grandes instrumentos automáticos para medições de cor e/ou opacidade/turbidimetria têm tido bastante êxito. A empresa Hitachi do Japão foi pioneira nesta automação em grande escala, trabalhando conjuntamente com a empresa Roche, mas há muitos outros fabricantes, incluindo Olympus e Bayer que produzem e fornecem tais instrumentos e reagentes. Estes instrumentos são espectrofotômetros automáticos multicavidades que medem a transmissão de luz através de uma mistura da amostra e dos reagentes, em diversos comprimentos de onda e em momentos diferentes. Uma vez que os imunoensaios turbidimétricos da cistatina C são realizados nesses instrumentos de elevada capacidade, isto constitui um outro motivo pelo qual se pretende que haja ensaios de cistatina C turbidimétricos de elevada qualidade.

A maior parte dos sistemas de imunoensaios homogêneos tem por base a mistura das amostras com soluções de reagentes que compreendem uma concentração perfeitamente

regulada do analito ou do análogo do analito marcado, e anticorpos com uma afinidade específica para esse analito. As moléculas do analito existentes na amostra competem com o analito ou com o análogo do analito marcado, sendo gerado um sinal. A vastíssima literatura sobre imunoenaios explica a utilização de diferentes marcadores e análogos. Faz-se observar que até ao momento presente tem sido limitado o sucesso da utilização de métodos de imunoenaios homogéneos para analitos de elevada massa molecular (massas moleculares superiores a 4000), que gerem sinais de cor. (Tem havido êxito utilizando técnicas de fluorescência, v.g., ensaios de proximidade, mas não existem no mercado muitos fluorómetros automáticos de elevada produtividade global e conseqüentemente estas tecnologias não servem para o objectivo da presente invenção). A tecnologia EMIT da empresa Syva e a tecnologia CDEIA da empresa Microgenics, ambas localizadas na Califórnia, têm tido êxito com sinais de cor em imunoenaios homogéneos para analitos de baixa massa molecular. No caso dos analitos de massa molecular elevada, as medições turbidimétricas aperfeiçoadas de partículas constituem a tecnologia que mais êxito teve para os espectrofotómetros automáticos de multicavidades, sendo medida a transmissão de luz através da mistura da amostra e dos reagentes. Deste modo, os métodos turbidimétricos são preferíveis para os analitos de massas moleculares mais elevadas. As descrições genéricas sobre métodos turbidimétricos estão explicitadas em diversas publicações sobre imunoenaios.

Por que motivo são necessárias medições de elevada precisão de cistatina C? Na perspectiva biológica, a literatura sobre a biologia da cistatina C e da creatinina,

e também no que respeita às meta-análises supramencionadas, apontam no sentido da utilização da cistatina C, em vez da creatinina, para monitorizar e diagnosticar uma taxa reduzida de filtração glomerular. No entanto, embora o argumento biológico seja a favor da utilização da cistatina C, a vantagem biológica apenas é importante se o rigor e a precisão dos ensaios da cistatina C forem bons. O rigor e a precisão das medições de creatinina são excelentes e a vantagem médica de se analisar a cistatina C em vez da creatinina deixa de existir se o rigor ou a precisão dos métodos de imunoensaios da cistatina C forem demasiado fracos.

O problema que a presente invenção pretende resolver consiste em proporcionar um método de imunoensaio de cistatina C imuno-turbidimétrico com maior rigor e/ou precisão e/ou menos interferência provocada pelos lípidos e pela hemoglobina existentes na amostra em ensaio, comparativamente com os correspondentes ensaios turbidimétricos existentes nos circuitos comerciais.

Um outro inconveniente da técnica anterior respeitantes às medições turbidimétricas da cistatina C é a velocidade diminuta de variação da turbidimetria, o que determina um período longo de ensaio e/ou uma imprecisão elevada. Um outro problema que a presente invenção pretende resolver consiste consequentemente em proporcionar medições turbidimétricas mais rápidas de cistatina C.

Newman *et al.*, 1995, *Kidney Int.* 47, 312-318, descrevem um método de imunoensaio turbidimétrico para avaliação da cistatina C, o qual consiste em utilizar nanopartículas com um diâmetro de 77 nm recobertas com imunoglobulina de coelho anti-cistatina C humana, sugerindo

a utilização de anticorpos monoclonais em vez de anticorpos policlonais. Um reagente de partículas de anticorpos optimizadas continha 0,5 mg de anticorpos policlonais por cada mL de partículas a 1%. Os autores sugerem a medição a um comprimento de onda de 340 nm.

Kyhse-Andersen, 1994, *Clin. Chem.* 40 (10), 1921-1926, descreve um método turbidimétrico para a determinação de cistatina C no soro, mediante a aplicação de imunopartículas de cistatina C com um diâmetro de 38 nm recobertas com aproximadamente 32 moléculas de IgG por partícula. A absorvência foi medida a 340 nm.

Finney *et al.*, 1997, *Clin. Chem.* 43 (69), 1016-1022, descrevem um método imunonefelométrico para a determinação da cistatina C, o qual consiste numa medição a 340 nm e numa aplicação de partículas de clorometil-estireno de 80 nm recobertas com anti-soro de coelho anti-cistatina C humana.

Lewis *et al.*, 2001, *Ann. Clin. Biochem.* 38(2), 111-114, descrevem um método de ensaio imunoturbidimétrico para determinação da cistatina C, efectuado a 340 nm e com parâmetros óptimos de pH, PEG e volume da amostra.

Mussap *et al.*, 1998, *Clin. Chem. Lab. Med.* 36(11), 859-865, descrevem um método imunonefelométrico para medições vulgares de cistatina C a 340 nm e mediante a aplicação de partículas de 80 nm recobertas com anti-soro de coelho anti-cistatina C humana.

Descrição abreviada dos desenhos

A figura 1 representa um gráfico de valores médios de cistatina C medidos de acordo com a invenção, em função do

factor de diluição para soros de diferentes pacientes, obtidos por regressão linear.

A figura 2 representa um gráfico de valores médios de cistatina C medidos de acordo com a invenção, em função do factor de diluição para soros de diferentes pacientes, obtidos por regressão linear de primeira ordem.

A figura 3 representa um gráfico de valores médios de cistatina C medidos de acordo com a invenção, em função do factor de diluição para soros de diferentes pacientes, obtidos por regressão linear de segunda ordem.

A figura 4 ilustra o gráfico de DL (%) para o soro 1 do ensaio do exemplo 4.

A figura 5 ilustra o gráfico de DL (%) para o soro 3 do ensaio do exemplo 4.

A figura 6 representa um gráfico de valores médios de cistatina C, em função do factor de diluição para o soro de um paciente, obtidos por regressão linear.

A figura 7 representa um gráfico de valores médios de cistatina C, em função do factor de diluição para o soro do paciente da figura 6, obtidos por regressão linear de segunda ordem.

A figura 8 representa um gráfico de valores médios de cistatina C, em função do factor de diluição para o soro do paciente da figura 6, obtidos por regressão linear de terceira ordem.

A figura 9 ilustra o gráfico de DL (%) para o soro A do ensaio do exemplo 5.

A figura 10 representa um gráfico de valores médios de cistatina C medidos de acordo com um método da técnica anterior, em função do factor de diluição para soros de

diferentes pacientes, obtidos por regressão linear (técnica anterior).

A figura 11 representa um gráfico de valores médios de cistatina C medidos de acordo com um método da técnica anterior, em função do factor de diluição para soros de diferentes pacientes, obtidos por regressão linear de primeira ordem.

A figura 12 representa um gráfico de valores médios de cistatina C medidos de acordo com um método da técnica anterior, em função do factor de diluição para soros de diferentes pacientes, obtidos por regressão linear de segunda ordem.

A figura 13 ilustra o gráfico de DL (%) para o soro 1 do ensaio do exemplo 6 (técnica anterior).

A figura 14 ilustra o gráfico de DL (%) para o soro 2 do ensaio do exemplo 6 (técnica anterior).

A figura 15 ilustra o gráfico de DL (%) para o soro 3 do ensaio do exemplo 6 (técnica anterior).

As figuras 16, 17 e 18 ilustram os resultados de investigação da correlação entre os métodos de ensaio de cistatina C: por turbidimetria de acordo com a presente invenção e por nefelometria de acordo com a técnica anterior.

Descrição abreviada da invenção

Os problemas supramencionados, associados à técnica anterior de imunoensaios turbidimétricos para a medição de cistatina C poderiam ser resolvidos, surpreendentemente, por meio de um método turbidimétrico, conforme definido nas reivindicações anexas e explicado de forma mais minuciosa nos parágrafos subsequentes da memória descritiva. O

referido método da invenção tira proveito, em particular, da utilização de complexos aperfeiçoados de nanopartículas e imunocjugados, o que permite uma medição mais rápida e/ou mais sensível e/ou mais fiável de cistatina C, em diversas condições experimentais, em particular, para diferentes concentrações de cistatina C, diferentes comprimentos de onda de medição, diferentes tempos de reacção e diferentes temperaturas. Há outras vantagens que se tornarão evidentes a partir das experiências adiantes descritas.

Fazendo cuidadosos ajustamentos de imunopartículas e facultativamente dos reagentes de ensaio, foi possível observar um sinal turbidimétrico surpreendentemente mais intenso e mais rápido e conseqüentemente foi possível reduzir as interferências e a linearidade pôde ser melhorada sem perda de rigor. Também foi possível reduzir o tempo de ensaio.

Os inventores da presente invenção concluíram, *inter alia*, que o tamanho das partículas tem que ser cuidadosamente equilibrado. As partículas grandes geram um sinal bom; no entanto, os sinais espontâneos são elevados e a capacidade de ligação é diminuta, pelo que é necessário juntar um lote de partículas, criando uma turvação espontânea ainda mais elevada. Os fornecedores já existentes de produtos para os ensaios, tais como a empresa Dako Cytomation AS, Dinamarca, que fornece produtos com os números de catálogo LX002/EFG/CS/25.10.04, S2361/EFG/KGR/09.07.03 e X0974/EFG/SUM/09.09.04, não conseguiram obter bons sinais turbidimétricos.

Definições de termos gerais

Uma "amostra corporal líquida", tal como utilizada no método de ensaio de acordo com a invenção, é uma amostra obtida a partir de um mamífero, em particular um ser humano, a qual contém cistatina C, em particular cistatina C humana. É possível utilizar qualquer amostra líquida que contenha cistatina C. As referidas amostras para serem analisadas de acordo com a invenção podem ser fluidos biológicos ou extractos de tecidos que contenham cistatina C e podem ser previamente tratadas, antes do ensaio. Como exemplos de amostras adequadas refere-se as amostras de sangues, fracções de sangue, tais como soro e plasma, e sangue previamente tratado, sangue tratado com EDTA ou plasma tratado com EDTA, plasma tratado com citrato, plasma tratado com heparina ou urina. As amostras obtidas originalmente ou as suas fracções podem ainda ser modificadas por processos conhecidos na especialidade, tais como, por exemplo, fraccionamento ou diluição. O fraccionamento pode ser efectuado com a finalidade de se remover constituintes que eventualmente possam falsear o ensaio. A diluição pode ser efectuada misturando a amostra original, ou fracção, com um líquido adequado para a amostra, por exemplo, um tampão adequado, com a finalidade de se ajustar a concentração dos constituintes, por exemplo, do analito. Tais amostras modificadas são exemplificativas de amostras "obtidas a partir da" amostra original de fluido corporal retirada ou isolada a partir do corpo do mamífero.

Um "analito" para ser analisado de acordo com a invenção é a cistatina C, em particular a cistatina C humana, tal como formada no corpo de um indivíduo saudável ou doente. Embora isso não seja necessário, eventualmente

também é possível utilizar como analito um derivado da cistatina C ou uma mistura da cistatina C natural e derivados da cistatina C. Como exemplos não limitativos de derivados de cistatina C refere-se os compostos de cistatina C portadores de um marcador detectável adequado, por exemplo, um isótopo radioactivo ou um marcador metálico ou cromóforo.

Os termos "avaliar" ou "avaliação" pretendem designar a determinação tanto quantitativa como qualitativa, no sentido de se obter um valor absoluto para a quantidade ou concentração do analito, no caso vertente a cistatina C, existente na amostra, e também para se obter um índice, coeficiente, percentagem, um indicador visual ou qualquer outro valor indicativo do nível de analito existente na amostra. A avaliação pode ser directa ou indirecta e as espécies químicas realmente detectáveis não têm de ser, como é evidente, o próprio analito, podendo ser, por exemplo, um seu derivado.

Os "imunoensaios homogéneos" são, em contraposição aos imunoensaios não homogéneos, de construção mais simples e permitem uma produtividade global superior. Em particular, os ensaios homogéneos não prevêm um passo de tratamento prévio da amostra, sob a forma de um passo de separação, por exemplo, aplicando a amostra sob uma matriz sólida, tal como uma coluna de cromatografia, nem a separação do analito relativamente a parte dos constituintes originais da amostra complexa original. Para um ensaio homogéneo, mistura-se a amostra e os reagentes, mantém-se tudo a incubar e procede-se às medições quer durante quer após a incubação. São utilizados os sinais em pontos críticos ou

diferenças de sinais entre medições em momentos diferentes ou medições cinéticas contínuas.

As medições ou imunoensaios turbidimétricos de uma "partícula melhorada" baseiam-se nas "propriedades de dispersão de luz" associadas às nanopartículas ou aos complexos de nanopartículas-imunoconjugados de acordo com a invenção, tal como utilizados de acordo com a invenção. Tais nanopartículas são, regra geral, aproximadamente esférica, de preferência, com uma distribuição dimensional estreita. O tamanho das referidas partículas é expresso normalmente através do seu diâmetro médio. De acordo com leis perfeitamente conhecidas sobre a dispersão de luz, as referidas propriedades de dispersão de luz podem ser influenciadas pelo tamanho das partículas e/ou pelo quociente entre o índice de refração das partículas e o do meio. As propriedades fracas de dispersão de luz podem resultar de partículas de tamanhos pequenos e/ou de um quociente diminuto entre o índice de refração das partículas e o do meio (ver também a lei de Rayleigh respeitante à dispersão de luz).

O tamanho e/ou o quociente respeitante ao índice de refração respeitante às nanopartículas são tais que podem provocar a dispersão de luz aos valores de comprimentos de onda utilizados para a detecção dos complexos de nanopartículas aglutinadas-imunoconjugados. De um modo geral, escolhe-se esse tamanho de modo a ser mais pequeno do que o comprimento de onda de detecção.

O "comprimento de onda de detecção", quando utilizado de acordo com a presente invenção para medição da variação da turvação da amostra, está compreendido normalmente entre

300 nm e 1200 nm, de preferência entre 400 nm e 700 nm e em particular entre 500 nm e 600 nm.

O "rigor" de um método analítico da presente invenção significa a aptidão de tais métodos para se determinar com exactidão a concentração de cistatina C numa amostra, comparativamente com a concentração quando determinada por um método de referência ainda mais fiável.

A "precisão" de um método analítico da presente invenção é a variação de resultados quando a concentração de cistatina C numa amostra é determinada repetidas vezes.

A "consistência" de um ensaio de acordo com a presente invenção é a aptidão dos métodos da invenção para tolerar substâncias interferentes e variações nas condições de ensaio sem que haja influência sobre o valor resultante da determinação da concentração da cistatina C.

Uma "proteína inerte", quando utilizada no contexto da invenção, é uma proteína com uma origem qualquer (por exemplo, de origem humana ou não humana, microbiana) que não vá falsear o método de ensaio da invenção; em particular, não deve ter nenhuma ou quase nenhuma afinidade detectável para com a cistatina C que se pretende analisar e/ou para com os anticorpos utilizados no método de ensaio da invenção.

Descrição minuciosa da invenção

a) Variantes preferenciais da invenção

De acordo com um seu primeiro aspecto a invenção diz respeito a um processo de imunoensaio turbidimétrico aperfeiçoado para partículas, para avaliação da cistatina C humana numa amostra de um líquido corporal humano ou numa

amostra obtida a partir daquela, de acordo com os passos seguintes:

(a) preparar uma mistura de ensaio colocando a referida amostra ou uma diluição obtida a partir dela em contacto com um conjugado de nanopartículas-anticorpos (ou nanopartículas-imunoconjugados), constituído por nanopartículas adequadas para medição turbidimétrica, em que as referidas nanopartículas são recobertas com um revestimento de um material proteínico que compreende anticorpos anti-cistatina C humana ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, que se ligam à referida cistatina C, em que as referidas nanopartículas recobertas têm um diâmetro mediano no intervalo compreendido entre valores superior a 58 nm e inferiores a 200 nm e

(b) avaliar o teor em cistatina C humana, medindo a variação da turvação da referida mistura;
em que o revestimento é tal que as referidas nanopartículas são recobertas com 10% a 35% de anticorpos que se ligam à cistatina C humana, relativamente ao peso total do conjugado de nanopartículas-anticorpos.

Uma outra variante da invenção diz respeito a um imunoensaio turbidimétrico para determinar as cistatina C humana numa amostra de um líquido corporal humano, executando os passos seguintes:

a) preparar um mistura de ensaio fazendo contactar a referida amostra com um conjugado de nanopartículas-anticorpos, constituído por nanopartículas adequadas para medição turbidimétrica, em que as referidas nanopartículas são recobertas com um revestimento de um material proteínico que compreende anticorpos de aves anti-cistatina C humana, ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, para

se ligarem à referida cistatina C, em que as referidas nanopartículas recobertas têm um diâmetro mediano no intervalo compreendido entre valores superior a 58 nm e inferiores a 200 nm e

b) avaliar o teor em cistatina C humana, medindo a variação da turvação da referida mistura.

De preferência, os referidos anticorpos são anticorpos policlonais não humanos, de não roedores, contra a cistatina C humana; em particular, os referidos anticorpos policlonais são anticorpos de aves contra a cistatina C humana.

De acordo com uma outra variante preferencial, pelo menos 25% em peso dos referidos anticorpos policlonais, ou dos seus fragmentos, são obtidos por purificação por afinidade com a cistatina C humana. Ao fazer-se a purificação por afinidade, a proporção dos anticorpos que se ligam à cistatina C humana vai aumentar. Além disso, eventualmente é possível fazer um enriquecimento ainda maior, por purificação por afinidade, em anticorpos que se ligam à cistatina C humana com uma afinidade (ou avides) superior às dos anticorpos que foram retirados da mistura.

Por exemplo, um anticorpo adequado, utilizado de acordo com a invenção, pode ter uma afinidade ou uma avides para a cistatina C humana que corresponda (ou seja substancialmente idêntica) à afinidade ou avides de um anticorpo de aves (por exemplo, policlonal) susceptível de ser obtido por purificação de afinidade de anticorpos de aves através da ligação de anti-soro de aves anti-cistatina C humana à cistatina C humana imobilizada sob uma fase sólida e depois, de preferência após a lavagem, por exemplo com saluto salino tamponado com fosfato, fazendo a eluição,

dos anticorpos ligados, com tampão citrato com uma molaridade compreendida no intervalo entre 0,05 M e 0,2 M, ou entre 0,08 M e 0,12 M, em particular de cerca de 0,1 M; e para valores de pH compreendidos entre cerca de 3 to 3,5, ou entre 3,1 e 3,3, em particular cerca de 3,2 (por exemplo, conforme explicado de forma mais minuciosa na parte experimental subsequente).

De acordo com uma outra variante, os referidos anticorpos compreendem (a) anticorpos monoclonais que se ligam a um epítipo singular de cistatina C humana ou (b) um conjunto de duas ou mais espécies de anticorpos monoclonais, em que cada uma das espécies de anticorpos monoclonais se liga a um epítipo diferente da cistatina C humana, ou duas ou mais espécies que se ligam a epítopos com uma força de ligação diferente (afinidade ou avidéz).

Os referidos anticorpos monoclonais ou são de origem humana ou de origem não humana (por exemplo, podem ser provenientes de roedores, ovinos, caprinos, aves ou coelhos).

As nanopartículas recobertas, quando utilizadas de acordo com a invenção, possuem preferencialmente um diâmetro médio superior a 58 nm, em particular um diâmetro médio no intervalo entre 59 e 160, entre 60 e 140, entre 70 e 120, entre 75 e 110, entre 80 e 105 ou entre 90 e 95 nm. De preferência são recobertas com uma camada de anticorpos. Em particular, a referida camada pode ser considerada como sendo uma monocamada com uma espessura aproximada de cerca de 5 nm. A camada pode estar "completa" (partículas saturadas com anticorpos) ou, mais preferencialmente, "incompleta" (isto é, são utilizados menos anticorpos do

que aqueles que a capacidade de ligação das partículas poderia suportar).

De acordo com uma outra variantes preferencial, as referidas nanopartículas recobertas estão recobertas incompletamente com cerca de 5% a 35%, em particular 10% a 30% ou 15% a 25% de anticorpos de aves ou com 10% a 30% ou 15% a 25% de anticorpos em geral, relativamente ao peso total do conjugado de nanopartículas-anticorpos.

De acordo uma outra variante preferencial, as nanopartículas são recobertas com uma mistura de anticorpos e de uma proteína inerte, de preferência hidrofílica. Por exemplo, entre 20% e 90%, mais preferencialmente entre 35% e 80% e ainda mais preferencialmente entre 40% e 70% da proteína total ligada à superfície das nanopartículas são constituídos pelo anticorpo anti-cistatina C. Tais partículas são portadoras de anticorpos numa quantidade que é inferior a quantidade de anticorpos que teoricamente podem ser fixados às partículas de acordo com a capacidade de ligação das referidas partículas não recobertas. Em simultâneo, as zonas das superfícies das partículas não recobertas com as moléculas de anticorpos são saturadas com a proteína inerte, de preferência hidrofílica.

De acordo com uma variante preferencial, as referidas nanopartículas originais, não recobertas, são feitas essencialmente de látex, poliestireno, policloreto de vinilo, resinas epóxi, policloreto de vinilideno, polimetacrilato de α -naftilo, polivinil-naftaleno e os seus correspondentes copolímeros. Neste domínio da técnica há outros materiais adequados para obtenção das partículas e um especialista na matéria, orientado pelos preceitos da

presente invenção, pode perfeitamente fazer uma selecção conveniente.

De acordo com uma outra variante do processo reivindicado, mede-se a variação da turvação através da variação da absorvência de luz pela referida mistura de ensaio, emita preferencialmente com um comprimento de onda no intervalo entre 500 nm e 600 nm, a uma temperatura no intervalo entre 10°C e 50°C, de preferência após um período de reacção entre 30 segundos e 600 segundos, por exemplo, 40, 40, 120, 260 ou 600 segundos.

A presente invenção também proporciona processos turbidimétricos de imunoenaios para a medição de cistatina C numa amostra de um líquido corporal ou numa amostra obtida a partir de um líquido corporal, caracterizados por se preparar uma mistura de ensaio fazendo contactar a referida amostra de líquido que contém a cistatina C, ou uma amostra obtida a partir de um líquido que contém cistatina C ou uma diluição de uma amostra que contenha cistatina C, com anticorpos ou fragmentos de anticorpos anti-cistatina C, policlonais ou monoclonais, ligados às nanopartículas para se ligarem à referida cistatina C, e avaliar o teor em cistatina C medindo a variação de turvação da mistura, sendo a turvação caracterizada melhor por uma variação da absorvência de luz com um determinado comprimento de onda na referida mistura, se a mistura for mantida durante um dado intervalo de tempo a uma dada temperatura após a formação da referida mistura com nanopartículas recobertas que tenham determinados tamanhos mínimos, conforme explicitado no quadro A subsequente.

Quadro A: intervalos de valores de mAbs Unidades/cm,
observados em diferentes condições de ensaio

Cistatina C µg/L	546 nm						505 nm			570 nm		
	37°C/260 s			32°C/ /600 s	37°C/ /120 s	37°C/ /40 s	37°C/260 s			37°C/260 s		
	*	**	***	*	*	*	*	**	***	*	**	***
9,9	>15	>25	>30	>12	>8	>4	>20	>30	>40	>10	>15	>20
19,8	>30	>55	>85	>25	>20	>7	>50	>75	>100	>30	>45	>55
34,1	>75	>125	>190	>75	>50	>15	>90	>150	>250	>80	>100	>125
diâmetro das nanopartículas recobertas > 58 nm												
* valores mínimos												
** valores mínimos preferíveis												
*** valores mínimos particularmente preferíveis												

A título de exemplo, os índices mais elevados de variação de absorvência são cerca de 4 vezes, de preferência cerca de 2 ou 3 vezes superiores aos níveis mais elevados supramencionados, conforme observado para cada situação experimental apresentada.

A título de exemplo, é possível obter os valores a seguir indicados.

Temperatura de 37°C, 260 segundos, diâmetro mediano igual a 92 nm:

concentração de cistatina C 9,9 µg/L: 65 Unidades mAbs/cm,

concentração de cistatina C 19,8 µg/L: 203 Unidades mAbs/cm,

concentração de cistatina C 26,6 µg/L: 244 Unidades mAbs/cm,

concentração de cistatina C 34,1 µg/L: 420 Unidades mAbs/cm,

concentração de cistatina C 44 µg/L: 623 Unidades mAbs/cm.

Temperatura de 32°C, 600 segundos, diâmetro mediano igual a 92 nm:

concentração de cistatina C 9,9 µg/L: 29 Unidades mAbs/cm,

concentração de cistatina C 19,8 µg/L: 62 Unidades mAbs/cm,
concentração de cistatina C 26,6 µg/L: 122 Unidades
mAbs/cm,

concentração de cistatina C 34,1 µg/L: 167 Unidades
mAbs/cm,

concentração de cistatina C 44 µg/L: 388 Unidades mAbs/cm.

Um outro processo preferencial de acordo com a invenção caracteriza-se - quando se constrói uma curva de correlação relativamente a um processo nefelométrico - pelo facto de se obter um valor de intercepção, para a concentração de cistatina, inferior a 0,15 mg/L, de preferência inferior a 0,1 mg/L e ainda mais preferencialmente inferior a 0,05 mg/L, com um processo turbidimétrico, para um valor correspondente de concentração de cistatina C de 0 mg/L com o processo nefelométrico.

Um outro processo preferível de acordo com a invenção caracteriza-se - quando se constrói uma curva de correlação relativamente a um processo de imunoensaio não homogénea - pelo facto de se obter um valor de intercepção, para a concentração de cistatina, inferior a 0,25 mg/L, de preferência inferior a 0,15 mg/L e ainda mais preferencialmente inferior a 0,5 mg/L, para um valor correspondente de concentração de cistatina C de 0 mg/L.

Um outro processo preferível de acordo com a invenção caracteriza-se por apresentar uma interferência, relativamente aos triglicéridos numa concentração de 15 mmol/L, na amostra experimental inferior a 6%, de preferência inferior a 4% e ainda mais preferencialmente inferior a 2% relativamente ao valor medido para a

cistatina C com uma concentração de cistatina C igual a 1,2 mg/L.

Um outro processo preferencial de acordo com invenção caracteriza-se pelo facto de apresentar um desvio relativamente à linearidade inferior a 5%, de preferência inferior a 4% ou mais preferencialmente inferior a 3% num intervalo de medição da concentração de cistatina C entre 1,32 e 7,5 mg/L e/ou um desvio em relação à linearidade inferior a 15%, de preferência inferior a 11% e ainda mais preferencialmente inferior a 7% na região de medição correspondente ao intervalo de medição de concentração da cistatina C entre 0,75 e 1,32 mg/L.

Um outro processo preferencial de acordo com a invenção caracteriza-se pelo facto de se determinar a concentração de cistatina C numa amostra, medindo a velocidade inicial de aumento da absorvência, (a) fazendo o registo directo no momento da mistura ou (b) fazendo o registo logo após se ter combinado a mistura com uma extrapolação regressiva até ao aumento de absorvência inicial ou (c) medindo a diferença de absorvências entre dois ou mais intervalos inferiores a 1 minuto após se ter misturado a amostra e os reagentes.

Um outro aspecto da invenção proporciona um processo para se avaliar a taxa de filtração glomerular de um mamífero, compreendendo tal processo a avaliação turbidimétrica da cistatina C humana de acordo com um processo tal como definido anteriormente. Tal processo pode ser aplicado, em particular, durante o diagnóstico ou a terapia de disfunções renais (por exemplo, insuficiência ou mal funcionamento renal) ou doenças ou patologias associadas a tais disfunções.

Há ainda mais um outro aspecto da presente invenção que diz respeito a um estojo de reagentes ou a um estojo de componentes, ou a um conjunto de reagentes para a execução do processo anteriormente definido, o qual compreende (a) partículas, constituídas por imunopartículas anti-cistatina C, tais como definidas anteriormente, numa forma anidra ou em suspensão, (b) um tampão de ensaio numa forma anidra ou dissolvida e, facultativamente, (c) misturas calibradoras e misturas de referência, qualquer delas numa forma anidra ou dissolvida ou em suspensão.

De preferência, as partículas e o tampão de ensaio são fornecidos conjuntamente, numa forma anidra ou em suspensão.

De acordo com um outro aspecto da invenção, são fornecidos conjugados de nanopartículas-anticorpos, de acordo com a definição anterior e de acordo com o texto subsequente mais minucioso.

A presente invenção diz respeito à utilização de tais conjugados de nanopartículas-anticorpos numa imunoensaio para a avaliação da cistatina C humana ou num método de diagnóstico para a avaliação da taxa de filtração glomerular de um mamífero.

Finalmente, a presente invenção diz respeito à utilização de tais conjugados de nanopartículas-anticorpos num imunoensaio para a avaliação da cistatina C humana ou num método de diagnóstico para a avaliação de disfunção renal, por exemplo, insuficiência ou mau funcionamento renal.

b) Preparação de anticorpos anti-cistatina C humana, aplicáveis num processo da invenção

b1) Anticorpos policlonais

É possível preparar anticorpos policlonais anti-cistatina C humana por processos perfeitamente conhecidos na especialidade, tais como os descritos, por exemplo, por Chase, M. W., 1967, em "Methods of Immunology and Immunochemistry", ed. Williams, A. et al., M. W., págs. 197-209, Academic Press, Nova Iorque. Dito de forma abreviada, efectua-se a imunização, repetidas vezes, de animais pertencentes a espécies convenientes (por exemplo, coelhos, caprinos ou ovinos ou, preferencialmente, aves, em particular aves domésticas, tais como galinhas), com antigénios purificados contidos num adjuvante adequado, por exemplo, adjuvante completo ou incompleto de Freund. Após a imunização, retira-se sangue dos animais e os anticorpos policlonais são purificados por processos, tais como, por exemplo, a precipitação com sulfato de amónio ou com cloreto de amónio, cromatografia de permuta aniónica, cromatografia de imuno-afinidade e/ou cromatografia de afinidade.

Para se conseguir obter um sinal turbidimétrico suficiente são preferíveis anticorpos de elevada avidéz. Uma vez que os anticorpos policlonais compreendem muitas moléculas de anticorpos diferentes, não é possível calcular uma constante de afinidade; no entanto, foram obtidos valores de elevada avidéz e afinidade por meio de técnicas convencionais com anticorpos policlonais. Foram utilizados anticorpos de coelhos, obtidos por processos convencionais, se bem que tenham sido obtidos resultados ainda melhores

com anticorpos de ovídeos. Foram obtidos resultados ainda melhores quando foram utilizados anticorpos de aves. Os anticorpos de aves podem ser obtidos de acordo com os processos descritos por Larsson A, Baaloew R-M, Lindahl T e Forsberg P-O em *Poultry Science* 72:1807-1812, 1993. Faz-se observar que sendo as aves geneticamente mais distintas dos seres humanos, são capazes de gerar anticorpos contra a cistatina C humana que têm uma avidéz mais elevada do que os anticorpos policlonais de mamíferos.

Os anticorpos policlonais de aves são obtidos vulgarmente a partir da clara de ovo (e por esse motivo são designados por IgY). No entanto, a clara de ovo contém grandes quantidades de lípidos que fazem com que seja problemática a sua utilização subsequente. Os IgY podem ser isolados a partir de clara de ovo recorrendo ao processo progressivo de precipitação com sulfato de amónio (por exemplo, 25% a 40%) e com polietileno-glicol (PEG). Para a purificação inicial também é possível utilizar estojos de purificação de IgY existentes nos circuitos comerciais, produzidos por Gallus Immunotch Inc, Cary, EUA, ou o estojo de purificação de IgY 'Eggcellent Chicken', que pode ser adquirido a Pierce, Rockford, EUA, tomando em consideração as instruções dos fabricantes.

Por outro lado, é possível aumentar ainda mais a avidéz dos anticorpos policlonais utilizando anticorpos que foram purificados mediante a prática de processos de purificação por afinidade com o antigénio, por exemplo, em conformidade com os preceitos da obra "Affinity Purification of Proteins", acessível em www.piercenet.com (Abril de 2006). A purificação por afinidade está descrita adiante de forma mais minuciosa.

Foi observada uma maior avidéz, em particular, quando 20% dos anticorpos utilizados haviam sido purificados por afinidade com o antigénio, observou-se um aumento ainda maior quando 50% dos anticorpos haviam sido purificados por afinada com o antigénio e observou-se um aumento muito maior quando mais de 75%, por exemplo, entre 75% e 100% dos anticorpos haviam sido obtidos por processos de purificação por afinidade com o antigénio.

Para se purificar por afinidade anticorpos policlonais de aves anti-cistatina C humana é necessário preparar uma coluna de afinidade adequada para cistatina C humana. A cistatina C humana purificada é fixada, por meio de um protocolo convencional a suportes sólidos adequados, por exemplo, sefarose ou Affigel, activados para ligarem de forma covalente o antigénio ao suporte (os suportes sólidos activados e convenientes podem ser adquiridos, por exemplo, a Pierce, Rockford, EUA). Depois, prepara-se uma coluna de afinidade a partir da referida resina portadora do antigénio.

A purificação de anticorpos por afinidade, feita com êxito, depende da apresentação eficaz dos epítomos relevantes, no antigénio, aos locais de ligação do anticorpo. Se o antigénio for pequeno e estiver imobilizado directamente numa superfície do suporte sólido, por múltiplas ligações químicas, epítomos importantes podem ficar bloqueados ou espacialmente imobilizados, impedindo uma ligação eficaz de anticorpos. Assim sendo, é melhor imobilizar os antigénios utilizando um grupo funcional único (v.g., um grupo sulfidrilo sobre um resíduo cisteína terminal singular num péptido) e utilizar um suporte activado cujos grupos reactivos ocorram em braços

espaçadores que tenham um comprimento de vários átomos. Para os antigénios maiores, especialmente aqueles que possuem locais múltiplos de imobilização, o comprimento do braço do espaçador torna-se menos importante uma vez que o próprio antigénio serve de espaçador eficaz entre a matriz de suporte e o epítopo.

Normalmente há pouca variação entre as condições típicas de ligação e de eluição para a purificação de anticorpos por afinidade, uma vez que a parte fundamental de cada procedimento é a afinidade de um anticorpo para o seu antigénio respectivo. Uma vez que os anticorpos são concebidos para reconhecerem antigénios e a eles se ligarem firmemente em condições fisiológicas, na maior parte dos procedimentos de purificação são utilizadas condições de ligação que simulam valores fisiológicos de pH e de força iónica. Os tampões de ligação mais vulgares são o soluto salino tamponado com fosfato (PBS) e o soluto salino tamponado com Tris (TBS) a pH 7,2 e NaCl 1,5 M (há embalagens de tampões previamente misturados que podem ser obtidas, por exemplo, em Pierce, Rockford, EUA). Logo que o anticorpo se tenha ligado a um antigénio imobilizado, utiliza-se mais tampão de ligação para se remover por lavagem o material não ligado, retirando-o do suporte. Para se minimizar a ligação não específica, o tampão de lavagem pode conter outros sais ou detergentes para destruir todas as interacções fracas.

Os anticorpos específicos e purificados são retirados da resina de afinidade por eluição, alterando as condições de pH e/ou força iónica do tampão (os tampões de eluição vulgares podem ser obtidos, por exemplo, em Pierce, Rockford, EUA). Em geral, os anticorpos são proteínas

resilientes que toleram valores de pH no intervalo entre 2,5 e 11,5 com perdas mínimas de actividade, sendo esta, de longe, a estratégia mais vulgar de eluição. Em alguns casos, a interacção entre anticorpo-antigénio não é eficientemente destruída pelas modificações de pH ou é danificada pelos valores de pH, exigindo que seja utilizada uma estratégia alternativa.

Seguidamente, apresenta-se um exemplo de um protocolo de purificação por afinidade.

Passo 1: lavar a coluna (~1 mL de leite de resina) para se remover as proteínas residuais antes de cada utilização, usando em sequência 10 volumes de coluna de cada um dos tampões a seguir indicados: glicina 0,2 M, pH 2,8 - 10 mL; NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,5, NaCl 0,5 M - 10 mL.

Repetir o ciclo duas vezes com os tampões indicados anteriormente. A seguir, equilibrar a coluna com tampão de TTBS (NaCl 0,3 M, Tris/Cl 20 mM, pH 7,8, 0,1% (v/v) de Tween-20 e 0,01% de NaN₃) contendo NaCl ajustado para 0,5 M.

Passo 2: adicionar a uma alíquota de 10 mL de preparação de anticorpos impura uma quantidade de 1 mL de TTBS 10x e 0,5 mL de NaCl 4 M. Centrifugar a mistura para se remover qualquer precipitado.

Passo 3: absorver os anticorpos por lotes, transferindo a resina de afinidade para um tubo (um tubo de 15 mL) contendo o soro. Manter a incubar no compartimento arrefecido. Em alternativa, é possível aplicar o soro à coluna fazendo-o correr em caudal lento. São obtidas fracções colhidas manualmente. Recolher a fase que passa através da coluna e reaplicá-la uma segunda vez fazendo-a correr em caudal lento.

Passo 4: lavar a coluna exaustivamente com TTBS + NaCl até 0,5 M, até o valor A_{280} ser inferior a 0,02. Recolher fracções de 10 mL dos produtos de lavagem e verificar os valores A_{280} das fracções.

Passo 5: fazer a eluição do anticorpo utilizando glicina 0,2 M a pH 2,8, contendo 0,02% de NaN_3 . fazer a eluição utilizando aliquotas de 1 mL de tampão. Recolher as fracções em tubos de microcentrifugação de 1,5 mL contendo 50 mL Tris 1 M a pH 8,5. Isto neutraliza o tampão de eluição ácido imediatamente após a eluição da proteína. Recolher pelo menos 10 fracções. Normalmente isto é suficiente para se remover o anticorpo. Fazer a leitura dos valores A_{280} de cada fracção. Utilizando um tampão de referência adequado (isto é, 1 mL de tampão de glicina + 50 mL de Tris 1 M).

Passo 6: juntar as fracções adequadas. Obter um valor A_{280} para a mistura de fracções e guardar os anticorpos a 4°C ou congelar a mistura (-70°C) em aliquotas, na presença de glicerol a 50%.

Passo 7: lavar a coluna exaustivamente com tampão de glicina 0,2 M a pH 2,8, seguindo-se a lavagem com TTBS.

b2) Anticorpos monoclonais

Frequentemente os anticorpos policlonais são mais preferenciais do que os anticorpos monoclonais nos ensaios turbidimétricos em partículas aperfeiçoados. Os anticorpos policlonais são inerentemente reactivos com inúmeros epítomos diferentes no antigénios (ou analitos) (contrariamente aos anticorpos monoclonais) e conseqüentemente criam mais facilmente interligações e redes entre as moléculas de antigénios *per si*, e entre os

antigénios e as partículas com as quais os anticorpos são imobilizados. Pelo contrário, os anticorpos monoclonais ligam-se geralmente apenas a um tipo de epítomos, o que faz com que seja mais difícil que formem ligações e redes. No entanto, a indústria de diagnóstico prefere frequentemente a utilização de anticorpos monoclonais, uma vez que é mais fácil fazer a sua normalização e o controlo de qualidade relativamente a um padrão pré-definido, especialmente ao longo de um período de validade do produto de vários anos. Assim sendo, há bons exemplos sobre a utilização de anticorpos monoclonais para imunoensaios turbidimétricos de partículas aperfeiçoados, especialmente quando há características antigénicas que favorecem a utilização de anticorpos monoclonais. Eda *et al.* em "Development of a New Microparticle-Enhanced Turbidimetric Assay for C-reactive protein With Superior features in Analytical Sensitivity and Dynamic range", *J. Clin. Lab. Analysis*, 12: 137-144 (1998) descrevem a utilização de dois anticorpos monoclonais diferentes e duas micropartículas diferentes. A CRP é especialmente favorável para a utilização de anticorpos monoclonais, uma vez que a molécula de CRP é um pentâmero de subunidades idênticas e conseqüentemente é portadora de cinco réplicas de todos os epítomos (Pepys MB *et al.*, *Adv. Immunol.* 34:141-212 (1983)), o que torna a utilização de anticorpos monoclonais muito mais fácil. No entanto, com proteínas monoméricas e mais pequenas, tais como a cistatina C, também é possível utilizar misturas de diferentes anticorpos monoclonais, em especial nas variantes da presente invenção. As misturas de diferentes anticorpos monoclonais, especialmente quando são constituídas por muitos anticorpos monoclonais diferentes

com elevada afinidade para a cistatina C, irão ter êxito em boas variantes da presente invenção de imunoenaios de cistatina C.

Os anticorpos monoclonais anti-cistatina C humana também podem ser preparados por métodos conhecidos na especialidade, por exemplo, os descritos por G. Köhler *et al.*, 1975, *Nature* 256, 495, G. Galfre *et al.*, 1981, *Meth. Enzymol.* 73, 3-46, ou R. Kennet, 1980, em: "Hybridomas: a new dimension in biological analysis", ed. R. Kennet *et al.*, Plenum press, Nova Iorque e Londres. São utilizados esplenócitos e células do sangue periférico provenientes de murganhos ou ratos imunizados que são fundidos com uma linhagem de células de mieloma, utilizando, por exemplo, o método de fusão com polietileno. Após a fusão, as células ficam a desenvolver-se em condições convenientes, por exemplo, em placas de cultura, sendo efectuada uma selecção de células correctamente fundidas utilizando, por exemplo, o método de selecção com hipoxantina/aminopterin/timidina (HAT). As linhagens de células produtoras de anticorpos são identificadas por métodos tais como EIA, RIA ou por ensaios de aglutinação. Após a identificação da linhagem celular produtora de anticorpos, as células são subclonadas repetidas vezes, por exemplo, pelo método de diluição limitada, para se garantir que a nova linhagem de células em desenvolvimento deriva de uma única célula.

b3) Anticorpos quiméricos

É possível obter anticorpos quiméricos anti-cistatina C humana por métodos perfeitamente conhecidos na especialidade, tais como os descritos por G. L. Boulianne *et al.*, 1984, *Nature* 312, 643-645. De forma abreviada, o

procedimento pode ser descrito conforme se segue. O ADN do local de ligação do antigénio, pertencente a um anticorpo monoclonal de uma espécie, ou suas partes, é transferido para o ADN da estrutura principal de um outro anticorpo de uma espécie diferente. Esta nova construção é clonada num vector de expressão que é transferido para o sistema de expressão correspondente para ser produzido o anticorpo.

b4) Anticorpos recombinantes

É possível obter anticorpos recombinantes anti-cistatina C humana sem necessidade de se utilizar veículos de origem animal, por métodos conhecidos na especialidade, tais como os descritos por G. Winter *et al.*, 1991, *Nature*, 349, 293 ou J. S. Huston *et al.*, 1988, *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*, 85, 5879. Tais métodos compreendem os passos seguintes: introdução de ADN (ADNc ou ADN sintético) que codifique um anticorpo, ou seus fragmentos, numa célula hospedeira, por exemplo, células de *E. coli*, fungos, leveduras, plantas ou eucarióticas, selecção de anticorpos com a especificidade e a afinidade desejadas e expressão do anticorpo, ou seus fragmentos, no sistema de expressão correspondente.

b5) Fragmentos de anticorpos

É possível preparar os fragmentos Fab, Fab' e F(ab')₂ de anticorpos policlonais e de anticorpos monoclonais de todas as espécies (incluindo os anticorpos quiméricos e os anticorpos recombinantes) por métodos perfeitamente conhecidos na especialidade, tais como os descritos, por exemplo, por A. Nissonoff *et al.*, 1960, *Arch Biochem Biophys*, 89, 230, ou R. P. Porter, 1959, *Biochem J*, 73,

119, ou E. Harlow et al. 1988, em "Antibodies-A Laboratory Manual", 626-631, Cold Spring Harbour Press, Nova Iorque, EUA.

b6) Selecção de anticorpos anti-cistatina C humana com reactividades diferentes para a cistatina C humana

Quando são utilizados anticorpos monoclonais, ou os seus fragmentos, como elementos correlativos de ligação, a selecção dos anticorpos de diferentes reactividades, em particular com reactividade elevada ou diminuta, pode ser feita convenientemente aplicando uma camada de cada um dos anticorpos monoclonais, separadamente, sobre nanopartículas do mesmo material e do mesmo tamanho, por meio de técnicas de revestimento convencionais, seguindo-se a mistura das nanopartículas e dos reagentes segundo uma determinada proporção, por exemplo, 1/1 v/v, de uma maneira permutável com o analito. Após a geração das curvas de calibração do reagente com as nanopartículas, nas mesmas condições, o declive acentuado das curvas de calibração resultantes para as concentrações diminutas de analito constitui uma primeira indicação da reactividade dos elementos correlativos imunológicos de ligação.

Quando são utilizados anticorpos policlonais como elementos correlativos de ligação, a preparação dos anticorpos policlonais de reactividades elevadas ou diminutas pode ser feita de acordo com métodos perfeitamente conhecidos na especialidade, introduzindo os anticorpos policlonais numa coluna de cromatografia de afinidade portadora do analito antigénico ligado, de forma covalente, à matriz de gel. Com um gradiente de tampão de eluição irá ocorrer em primeiro lugar a eluição das

fracções de anticorpos policlonais de reactividade diminuta, para fora da coluna, seguindo-se as fracções com reactividades cada vez maiores (ver S. Yamamoto *et al.*, 1993, "Veterinary Immunology and Immunopathology", 36, 257-264, Elsevier Science Publishers B. V., Amesterdão). A reactividade das fracções pode ser confirmada depois quer com um instrumento 'BIAcore' ou aplicando-as em camada, independentemente, sobre nanopartículas do mesmo tamanho e feitas do mesmo material e gerando as correspondentes curvas de calibração.

A selecção de anticorpos pode ser feita pelo procedimento supramencionado que consiste em recobrir nanopartículas com as referidas fracções, seguindo-se uma análise de limite de detecção ou uma determinação da sua afinidade funcional, conforme descrito *supra*. Se isso for conveniente, é possível utilizar misturas de diferentes anticorpos anti-cistatina C humana que diferem entre si no que respeita à sua afinidade/avidez perante a cistatina C humana, para a preparação de conjugados de nanopartículas-anticorpos da presente invenção. Um especialista na matéria sabe como determinar as proporções de mistura convenientes, recorrendo a uma série limitada de experiências.

Também estão disponíveis nos circuitos comerciais anticorpos adequados anti-cistatina C humana, provenientes de diversas fontes. Por exemplo, a empresa HyTest da Finlândia coloca no mercado um conjunto de anticorpos de elevada afinidade anti-cistatina C humana que reconhecem diferentes epítomos do antigénio. Estes anticorpos são preparados de uma maneira convencional, imunizando murganhos da estirpe Balb/c com cistatina C purificada proveniente de urina humana, e produzindo hibridomas por

fusão com a linhagem celular de hibridoma Sp2/0. os anticorpos produzidos por clones seleccionados foram purificados por cromatografia de afinidade com proteína A. Presentemente é possível obter na empresa HyTest os mAbs seguintes: Cyst10, Cyst13, Cyst16, Cyst18, Cyst19, Cyst23, Cyst24 e Cyst28. Outros fornecedores que comercializam anticorpos monoclonais ou policlonais anti-cistatina C humana são os seguintes: Fusion, Irlanda do Norte; BioVendor, República Checa, AB Location, Alemanha; Advanced Immunicemical, EUA; Abeam, RU; Axxora, RU; Biodesign, EUA; R&D Systems, EUA; AbD Serotec, Noruega; Strategic Biosolutions, EUA. Em princípio, é possível utilizar todos os anticorpos anti-cistatina C humana provenientes das referidas fontes, por si sós ou combinadamente para a prática da presente invenção.

c) Nanopartículas e seus conjugados com anticorpos

O material para a preparação de nanopartículas da invenção pode ser qualquer material natural ou sintético, inorgânico, orgânico, polimérico ou não polimérico, adequado para gerar e realizar ensaios de dispersão de luz realçada por partículas. Tais materiais compreendem, por exemplo, selénio, carbono, ouro; nitretos de carbono, silício ou germânio, por exemplo, Si_3N_4 ; óxidos de ferro, titânio ou silício, por exemplo, TiO_2 ou SiO_2 ; e materiais poliméricos, tais como, por exemplo, látex, poliestireno, policloreto de vinilo, resinas epóxi, policloreto de vinilideno, polimetacrilato de α -naftilo, polivinil-naftaleno, ou seus copolímeros, em particular os copolímeros de estireno e de um composto etilenicamente insaturado copolimerizável, por exemplo, copolímeros de

estireno-(met)acrilato. Também são adequadas as partículas feitas de materiais poliméricos e também as partículas de núcleo-invólucro constituídas por um núcleo interior polimerizado a partir de estireno e um invólucro exterior obtido por copolimerização a partir de estireno com um composto etilenicamente insaturado copolimerizável, conforme descrito, por exemplo, na patente de invenção norte-americana nº 4 210 723.

As partículas poliméricas adequadas para a conjugação podem ser adquiridas a Bangs Particles Inc. ou Interfacial Dynamics Inc, Merck SA, França, ou noutras fontes convenientes. As partículas podem ser activadas para ligação a anticorpos, de acordo com diversos métodos, podendo ser encontrados preceitos explicativos exaustivos sobre a referida química de acoplamento, v.g., em TechNote 205, Rev. 003, por exemplo, de Março de 2002, a obra "Covalent Coupling", de Bangs Laboratories, Inc. pode ser obtida no website. Por exemplo, o acoplamento pode ser feito por meio de partículas que transportam sobre a sua superfície grupos carboxilo, amino, hidroxilo, hidrazida ou clorometilo. A molécula que irá ser acoplada pode reagir directamente com tais grupos ou pode reagir através de um ligador adequado, por exemplo, carbodiimidas, glutaraldeído ou brometo de cianogénio.

O invólucro das partículas de acordo com a presente invenção tem de possuir, preferencialmente, anticorpos com afinidades elevadas para a cistatina C, sendo combinado com um núcleo de uma nanopartícula com um determinado tamanho para que seja gerado um sinal turbidimétrico suficiente. De uma forma típica, as nanopartículas que compreendem o invólucro de material proteínico têm dimensões

compreendidas entre 58 nm e 200 nm, mais preferencialmente entre 65 nm e 150 nm e ainda mais preferencialmente entre 80 nm e 135 nm.

De acordo com uma variante particular da invenção, o diâmetro médio das partículas não revestidas é de cerca de 80 nm. Utilizando estas partículas, depois de revestidas têm um diâmetro tipicamente entre 90-100 nm. Como regra geral, uma monocamada de anticorpos tem uma espessura de cerca de 5 nm, pelo que se considera então que tais partículas são portadoras de uma monocamada de anticorpos.

Estas partículas irão proporcionar bons resultados quando 5% a 35% do peso seco total das partículas conjugadas é constituído por anticorpos e irão proporcionar resultados melhores para valores entre 10% e 30% e irão proporcionar resultados óptimos quando 15% a 25% do peso seco total das partículas conjugadas fórmula geral constituído por anticorpos.

Se forem utilizadas partículas ligeiramente maiores estes valores percentuais óptimos passam a ser menores. A título de exemplo, se forem utilizadas partículas desguarnecidas de 95 nm, tipicamente acabam por adquirir um diâmetro mediano de 110 nm quando recobertas. As percentagens correspondentes são então 4% a 32%, 8% a 26% e para se obter resultados óptimos 12% a 22% (percentagens do peso seco total das partículas conjugadas constituídas por anticorpos). No entanto, com estas partículas ligeiramente maiores, é necessário utilizar mais partículas (significando isso um peso maior de partículas) no ensaio para se obter uma capacidade de ligação suficiente para criar uma curva de calibração sem um nivelamento da curva aos valores de concentração mais elevados de cistatina C (a

curva de calibração do ensaio tem de apresentar um bom intervalo dinâmico que vá além de 8 µg de cistatina C por cada µL de amostra), o que conduz a um sinal espontâneo de absorção muito superior (partículas maiores e mais partículas) e a uma menor relação sinal/ruído.

Por outro lado, as partículas mais pequenas irão proporcionar um maior valor óptimo de percentagem de anticorpos nas imunopartículas recobertas. Por exemplo, se forem utilizadas partículas com um tamanho de 70 nm e não recobertas, o diâmetro mediano das partículas recobertas irá ser tipicamente igual a 80 nm e uma proporção entre 18% e 30% de anticorpos relativamente ao peso seco total das partículas conjugadas irá corresponder a percentagens óptimas, estando as proporções menos óptimas compreendidas entre 12% e 36% e estando as proporções ainda menos óptimas compreendidas entre 4% e 42% de anticorpos. No entanto, com estas partículas ligeiramente mais pequenas, têm de ser utilizadas menos partículas (significando isso um peso menor de partículas) no ensaio para se criar uma curva de calibração com um declive suficiente para os valores mais baixos das concentrações, isto é, inferiores a 1 µg de cistatina C por cada µL de amostra, sendo o sinal menor e também mais vulnerável ao ruído espontâneo.

Com base na explicação anterior, um especialista na matéria fica habilitado, em conformidade com os preceitos da presente invenção, a fazer preparações óptimas de imunopartículas para diversas condições de ensaio.

A aplicação de anticorpos anti-cistatina C humana sobre nanopartículas pode ser efectuada de modo adsortivo ou de modo covalente, em conformidade com métodos

perfeitamente conhecidos na especialidade adequados às propriedades do material utilizado.

De acordo com uma variante preferencial, durante a conjugação/ligação dos anticorpos às nanopartículas devem estar presentes misturas de uma ou várias proteínas hidrofílicas inertes com os anticorpos anti-cistatina C. Os inventores verificaram, surpreendentemente, que se obtém resultados óptimos com partículas hidrofílicas com uma elevada capacidade de ligação quando os anticorpos são conjugados com as partículas conjuntamente com proteínas hidrofílicas que possuam valores de pH próximos do valor de pH de conjugação. Foram obtidos os melhores resultados quando a transferrina e a albumina de bovino se encontravam presentes durante a conjugação. No entanto, também é possível misturar outras proteínas inertes com os anticorpos durante a conjugação. Como exemplos não limitativos de tais proteínas hidrofílicas inertes refere-se a hemocianina de moluscos gastrópodes, a haptoglobina e outras proteínas solúveis em água, sem nenhuma afinidade para os anticorpos nem para a cistatina C.

Durante o processo de acoplamento as condições são, ou devem ser, ou então, se necessário, devem ser adaptadas para que assim sejam, tais que os anticorpos sejam mais reactivos com o material do núcleo das nanopartículas do que com a proteína inerte, para que assim se liguem mais ou menos quantitativamente ao núcleo. As partes reactivas residuais da superfície das nanopartículas irá ficar bloqueada pelas proteínas inertes.

Os inventores da presente invenção verificaram, como regra geral, que num primeiro passo as partes hidrofóbicas dos anticorpos parecem ligar-se fisicamente às partículas e

por esse motivo toda a molécula está próxima dos grupos reactivos, por exemplo, grupos clorometilo, existentes sobre a superfície da partícula, reagindo depois com os grupos correspondentes, por exemplo, grupos amina, da molécula de proteína. Devido a esta absorção física, as moléculas de anticorpos grandes completam-se surpreendentemente bem com as proteínas hidrofílicas inertes mais pequenas, tais como a albumina e a transferrina. No entanto, uma vez que são utilizados menos anticorpos do que os que correspondem à capacidade de ligação das partículas, as proteínas inertes, tais como as albuminas e as transferrinas, reagem com tudo quanto possa reagir existente sobre a superfície das partículas e proporcionam então partículas da presente invenção que têm simultaneamente uma boa superfície hidrofílica e uma boa capacidade de ligação de anticorpos, e uma proporção adequada de material das nanopartículas que consegue gerar um sinal bom.

A adaptação de condições adequadas a cada variante do processo de revestimento, à luz dos preceitos aqui explicitados, é uma matéria de rotina para um especialista na matéria.

Por exemplo, para o acoplamento é possível escolher um valor de pH meia unidade acima do valor de pH do anticorpo, quando são utilizados anticorpos monoclonais. Os anticorpos policlonais têm um pH bastante diverso e por isso, com anticorpos policlonais, eventualmente pode ser preferível escolher um valor de pH igual a 8,8.

De acordo com uma variante preferencial, com base no teor total em proteínas da mistura de reacção de acoplamento, entre cerca de 3% e 70% em peso ou ainda mais

preferencialmente entre 5% e 40% em peso das proteínas presentes durante a conjugação devem ser constituídos por anticorpos anti-cistatina C.

Uma vez que os anticorpos têm, conforme explicitado anteriormente, um grau de ligação às partículas superior ao das proteínas hidrofílicas inertes, a proporção entre proteínas de anticorpos e proteínas totais ligadas à superfície das partículas irá ser muito maior; por exemplo, entre 20% e 90%, mais preferencialmente entre 35% e 80% e ainda mais preferencialmente entre 40% e 70% das proteínas totais ligadas à superfície das partículas são constituídos pelos anticorpos.

d1) Vantagens da invenção

A presente invenção proporciona um imunoensaio turbidimétrico de cistatina C com uma relação sinal/ruído muito mais intensa do que a da técnica anterior. Escolhendo partículas com núcleos grandes e invólucros proteínicos, de preferência com um determinado tamanho mínimo, combinadas com anticorpos purificados por afinidade com antigénios, obteve-se um sinal de agregação surpreendentemente elevado. Obteve-se um sinal turbidimétrico forte devido a um surpreendente efeito sinérgico entre o índice de refração das partículas, comparado com o do tampão de ensaio, e a elevada afinidade (ou avidéz) dos anticorpos altamente purificados. O sinal turbidimétrico forte determinou uma maior consistência em relação a substâncias interferentes, v.g., triglicéridos, e uma linearidade melhor do que a dos imunoensaios turbidimétricos de cistatina C de acordo com a técnica anterior.

O factor crítico para um imunoensaio homogéneo é o sinal gerado por unidade de massa do volume da mistura para ensaio. A mistura para ensaio é a mistura obtida quando foram já acrescentados todos os reagentes e a amostra. Por exemplo, no caso de se pretender analisar uma amostra de 3 μL e se a referida amostra contiver cistatina C na concentração de 1 $\mu\text{g/L}$ e o volume final depois de misturado todos os reagentes e a amostra for de 300 μL , a concentração de cistatina C na mistura final para ensaio é de 10 $\mu\text{g/L}$. Se a concentração do analito na amostra for diminuta, isto pode ser compensado normalmente utilizando uma amostra maior comparativamente com o volume de mistura para ensaio, *v.g.*, aumentando a amostra para 6 μL numa volume de mistura para ensaio igual a 300 μL . Há diversos obstáculos ao aumento do volume da amostra. Em primeiro lugar, a concentração de todas as substâncias interferentes que possam estar presentes na amostra é aumentada na mistura para ensaio. Em segundo lugar, aumenta a necessidade em anticorpos para superar o efeito de gancho crítico (isto é, uma curva dose/resposta com declive negativa), o que por sua vez faz aumentar correspondentemente o custo dos anticorpos utilizados no ensaio.

Assim sendo, há um requisito que consiste em fazer ensaios com boa intensidade do sinal e consistentes, com uma concentração diminuta do analito na mistura para ensaio e um correspondente volume diminuto de amostra. O aumento do volume da amostra em imunoensaios homogéneos implica mais interferência e mais ensaios dispendiosos.

A presente invenção proporciona um aumento surpreendente da intensidade do sinal, da consistência e da linearidade de imunoensaios turbidimétricos da cistatina C.

De acordo com a presente invenção também há menos interferência provocada por lípidos tais como os triglicéridos. A invenção foi levado a bom termo depois de se compreender que as insuficiências da técnica anterior se baseavam numa intensidade demasiadamente fraca do sinal turbidimétrico emitido por unidade de massa do analito, e proporciona processos com melhor precisão e linearidade e menos interferência do que os métodos turbidimétricos da técnica anterior.

d2) Aperfeiçoamentos concretos observados em diferentes condições experimentais

De acordo com a presente invenção, esta proporciona processos aperfeiçoados de imunoenaios turbidimétricos para a medição da concentração de cistatina C numa amostra de um líquido corporal ou numa amostra obtida a partir de um líquido corporal, caracterizando-se tais processos pelo facto de se

preparar uma mistura para ensaio fazendo contactar a referida amostra líquida que contém a cistatina C, ou uma amostra obtida a partir de um líquido que contenha cistatina C, ou uma diluição de uma amostra que contenha cistatina C, com anticorpos ou fragmentos de anticorpos policlonais anti-cistatina C, ligados a nanopartículas que vão ligar-se à referida cistatina C e

avaliar o teor em cistatina C, medindo a alteração de turvação da mistura, sendo a turvação caracterizada ainda por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 546 nm

superior a 15 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio ou

superior a 30 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio ou

superior a 75 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio, se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos depois de se ter formado a mistura, caracterizando-se também o processo pelo facto de o diâmetro mediano das referidas nanopartículas a que estão ligados os conjugados de anticorpos ou de fragmentos de anticorpos policlonais anti-cistatina C ser superior a 58nm

Isto é especialmente benéfico uma vez que o comprimento de onda de 546 nm e a temperatura de 37°C é um modo de funcionamento típico para muitos analisadores automáticos de química clínica, tais como os instrumentos da Hitachi, Cobas e Modulas da Roche, Olympus e muitos mais.

A presente invenção proporciona também um processo aperfeiçoado caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 546 nm

superior a 25 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

superior a 55 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio

superior a 125 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio,

se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos após a formação da mistura, o que é vantajoso pelo mesmo motivo.

Mais ainda, a presente invenção proporciona um processo, caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 546 nm

superior a 30 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

superior a 85 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio

superior a 125 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 190 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio,

se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos após a formação da mistura, o que é vantajoso pelo mesmo motivo.

Diversos instrumentos analíticos espectrofotométricos trabalham em comprimentos de onda inferiores. Assim sendo, a presente invenção proporciona também um processo caracterizado por uma modificação caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 505 nm

superior a 20 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

superior a 50 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio

superior a 90 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio,

se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos após a formação da mistura.

Em particular, a presente invenção proporciona um processo caracterizado por uma modificação caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 505 nm

superior a 30 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

superior a 75 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio

superior a 150 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio, se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos após a formação da mistura.

Mais ainda, a presente invenção proporciona um processo caracterizado por uma modificação caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 505 nm

superior a 40 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

superior a 100 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio

superior a 250 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio, se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos após a formação da mistura.

Há outros instrumentos analíticos espectrofotométricos que podem trabalhar com comprimentos de onda superiores.

Assim, a presente invenção proporciona também um processo caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 570 nm

superior a 10 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou superior a 30 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio superior a 80 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio, se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos após a formação da mistura.

Em particular, a presente invenção proporciona um processo caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 570 nm

superior a 15 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou superior a 45 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio superior a 100 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio, se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos após a formação da mistura.

Além disso, presente invenção proporciona um processo caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 570 nm

superior a 20 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou superior a 55 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio superior a 125 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio,

se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos após a formação da mistura.

Há diversos instrumentos de análise para química clínica que trabalham a uma temperatura inferior a 37°C.

Assim sendo, a presente invenção proporciona um processo caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 546 nm

superior a 12 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

superior a 25 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio

superior a 70 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio,

se a referida mistura for mantida a 32°C durante 600 segundos após a formação da mistura.

É grande a procura de um processo de ensaio mais rápido e mais eficiente, com a finalidade de se aumentar a capacidade dos instrumentos automáticos utilizados em química clínica. Se um ensaio for efectuado mais rapidamente, é possível fazer mais ensaios por unidade de tempo. Em especial, se os instrumentos forem construídos para trabalharem em modo cinético, é vantajoso que haja um aumento rápido e intenso do sinal após o início do ensaio. Deste modo, a presente invenção proporciona um processo caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 546 nm

superior a 8 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

superior a 20 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio

superior a 50 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio, se a referida mistura for mantida a 37°C durante 120 segundos após a formação da mistura.

Em particular, a presente invenção proporciona um processo caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 546 nm

superior a 15 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

superior a 30 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio

superior a 75 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio, se a referida mistura for mantida a 37°C durante 120 segundos após a formação da mistura.

Mais ainda, a presente invenção proporciona um processo caracterizado por uma modificação da absorvência da referida mistura para uma luz com um comprimento de onda de 546 nm

superior a 4 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

superior a 7 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio

superior a 15 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio, se a referida mistura for mantida a 37°C durante 40 segundos após a formação da mistura.

d3) Resultados obtidos em condições idênticas com um sistema turbidimétrico da técnica anterior

Conforme explicitado anteriormente, o tamanho das nanopartículas utilizadas no ensaio tem de ser cuidadosamente equilibrado. As partículas grandes dão origem a um sinal bom; no entanto, a emissão espontânea é elevada e a capacidade de ligação é diminuta, pelo que é necessário acrescentar um lote de partículas, dando origem a uma turvação espontânea elevada. Os fornecedores conhecidos de produtos para ensaios, tais como Dako Cytomation As, presumivelmente por este motivo importante não conseguiram obter bons sinais turbidimétricos.

Quando se trabalha em conformidade com as instruções do tipo das apresentadas no folheto inserido na embalagem de Dako Cytomation As, com os números de catálogo LX002/EFG1CS/25.10.04, S2361/EFG1KGR/09.07.03 e X0974/EFG/SUM/09.09.04 e tendo em conta o artigo escrito por Schmidt, Kjoller e Gronkjaer supramencionado, resultou daí um processo turbidimétrico de imunoensaios para a cistatina C caracterizado - quando se trabalha com um comprimento de onda de 546 nm a 37°C e durante 260 segundos - por uma modificação da absorvência apenas igual a 9 mUnidades Abs para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio, apenas igual a 24 mUnidades Abs para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio, e apenas igual a 50 mUnidades Abs para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio.

Estes resultados estão bastante aquém dos resultados observados com a presente invenção (ver *supra*).

Ao tentar utilizar um período de ensaio mais curto (próprio para leituras cinéticas), igual a 120 segundos, obteve-se uma modificação da absorvência

apenas igual a 6 mUnidades Abs para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio

apenas igual a 15 mUnidades Abs para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio e apenas igual a 24 mUnidades Abs para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio,

resultados estes que são bastante inferiores aos resultados obtidos com a presente invenção.

por outro lado, quando se tenta utilizar um tempo de ensaio ainda mais curto (conveniente para leituras cinéticas), igual a 40 segundos obtém-se como resultado uma modificação da absorvência

apenas igual a 3 mUnidades Abs para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio

apenas igual a 6 mUnidades Abs para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio apenas igual a 9 mUnidades Abs para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura para ensaio, resultados estes que são bastante inferiores aos resultados obtidos com a presente invenção.

O tempo de ensaio supramencionado é definido como sendo o tempo que decorre desde a adição da suspensão de imunopartículas à mistura dos reagentes de ensaio e da amostra. Todos os volumes e sequências executadas estavam em conformidade com as recomendações do fabricante. As concentrações de cistatina C foram determinadas recorrendo a processos de referência nefelométricos 'ProSpec'

desenvolvidos por Dade-Behring US, com o número de catálogo OQNM13 N Latex cistatina C.

e) Execução do processo de ensaio da presente invenção

De acordo com uma variante preferível da presente invenção, mistura-se um tampão de ensaio com uma amostra e com uma suspensão de imunopartículas e faz-se a monitorização da turvação da mistura ou da suspensão resultante por meio de um fotómetro, preferencialmente um fotómetro de registo e ainda preferencialmente um espectrofotómetro de registo. Uma sequência preferencial de passos é a seguinte: misturar a amostra com o tampão de ensaio, permitindo que a mistura se dissolva totalmente e estabilize e acrescentar depois a mistura de imunopartículas. A presente invenção também pode ser levada à prática misturando em primeiro lugar o tampão de ensaio e a suspensão de imunopartículas e acrescentando então e misturando a amostra. Devem ser aplicados processos óptimos de mistura (seleccionados entre processos perfeitamente conhecidos na especialidade), os quais podem ser determinados por meio de um número limitado de experiências prévias.

Quando se utiliza um fotómetro de registo, a velocidade inicial de aumento da turvação pode ser obtida quer determinando a concentração de cistatina C numa amostra, medindo a velocidade inicial de aumento da absorvência, quer por registo directo no momento da mistura, ou fazendo um registo imediatamente após a operação de mistura combinada com uma extrapolação regressiva para os valores iniciais de aumento de absorvência, ou medindo a diferença de absorvências entre

dois ou mais instantes inferiores a 1 minuto após a operação de mistura da amostra e dos reagentes.

As medições, ou as medições combinadas, podem ser correlacionadas ou comparadas com os correspondentes resultados produzidos por calibradores de concentrações conhecidas de cistatina C, podendo a concentração de amostras desconhecidas ser então calculada. Estas maneiras de se registrar os valores de absorvência e de calcular os resultados são perfeitamente conhecidos para muitas outras substâncias para as quais um especialista em química clínica pretende fazer medições. Como é evidente, o sinal bastante bom obtido em conformidade com a presente invenção faz com que tais medições e cálculos sejam muito mais consistentes e rigorosos, especialmente quando são obtidos sinais bons imediatamente após a operação de mistura da amostra e dos reagentes, conforme descrito anteriormente.

É possível utilizar diversas misturas de tampões de ensaio, com diferentes tipos de substâncias tampão, com diferentes tipos de detergentes e/ou com diferentes tipos de polímeros e/ou com diferentes sais acrescentados ao tampão.

É possível utilizar o tampão TRIS, o tampão fosfato, o tampão borato e outras substâncias tampão, tais como MOPS, PIPES, HEPES as quais não são críticas para a presente invenção, desde que no ensaio se consiga manter um valor de pH perfeitamente regulado na mistura de ensaio final, independentemente desse valor de pH e da capacidade de tamponamento da amostra acrescentada. De uma forma típica acrescenta-se o tampão numa proporção molar final compreendida entre cerca de 5 mM e 0,2 M ou entre 10 mM e

0,1 M. Ajusta-se o valor do pH no intervalo entre 6 e 8, em particular entre 6,5 e 7,5.

Por outro lado, é possível utilizar diversos detergentes desde que consigam dissolver qualquer conteúdo de lípidos existentes na amostra acrescentada e não interfiram de forma exagerada com a reacção dos anticorpos com a cistatina C introduzida com a amostra. Os triglicéridos, os colesteróis e muitas outras lipoproteínas são exemplos de substâncias que interferem nos ensaios turbidimétricos uma vez que os lípidos formam microgotículas e micelas que dão origem a sinais que provocam interferência. Como exemplos de detergentes adequados refere-se as substâncias Tween 20, Triton X-100 e desoxicolatos. A medição de cistatina C em amostras que contenham lípidos constitui um grande desafio e exige uma boa solubilidade dos lípidos, mas é ainda mais importante um sinal forte que supere todas as interferências secundárias. Os detergentes são acrescentados tipicamente numa proporção final compreendida entre 0,01 e 0,5% ou entre 0,1 e 0,3%, calculada relativamente ao peso da mistura de reacção final.

Os polímeros mais vulgarmente utilizados são os polietileno/glicóis de diferentes massas moleculares (em particular entre 6000 e 8000), mas também é possível utilizar dextrans e outros polímeros. Os polímeros têm o inconveniente de criarem, quando a concentração é demasiadamente elevada, uma precipitação não específica das outras substâncias introduzidas quando a amostra estudada é misturada na mistura de ensaio. Por outro lado, os referidos polímeros aumentam simultaneamente o sinal. No entanto, têm tendência para reduzirem a capacidade global

de ligação das imunopartículas. Os polímeros são acrescentados tipicamente numa proporção final compreendida entre cerca de 0,05 e 0,5% ou entre cerca de 0,1 e 0,3%, sendo cada uma delas calculada em relação ao peso da mistura de reacção final.

Os sais convenientes para se adaptar a força iónica são, por exemplo, halogenetos de metais alcalinos, em particular o cloreto de sódio, sendo acrescentado com uma concentração compreendida entre 1 e 100 mM ou entre 5 e 50 mM.

Outros constituintes adequados que podem estar presentes na mistura para ensaio são:

aminoácidos, tais como glicina acrescentados até uma concentração final compreendida entre cerca de 1 e 50 mM ou entre 5 e 20 mM;

proteínas, tais como a albumina, acrescentadas até proporções finais entre 0,1 e 5 g/L ou entre 0,5 e 2 g/L; agentes antimicrobianos, tais como azida de sódio, acrescentados até proporções finais entre 0,1 e 10 ou entre 1 e 5 g/L;

Calibradores ou substâncias de referência: são tipicamente soluções que contém concentrações conhecidas de cistatina C dissolvida numa substância tampão, tipicamente um tampão fosfato ou o tampão TRIS, facultativamente com uma determinada quantidade de um material proteínico, compreendo facultativamente soro de origem humana ou animal até 100% em volume (se a proporção de soro for 100% em volume, então não haverá nenhuma solução tampão nem necessidade dela).

É possível utilizar um ou vários dos reagentes numa forma anidra facultativamente liofilizados. Os anticorpos

conjugados com as nanopartículas podem ser utilizados numa forma anidra, v.g., sob a forma de grânulos, e podem ser dissolvidos antes da utilização, ou podem ser dissolvidos no reagente tampão de ensaio ou na mistura de reacção. É possível acrescentar um ou vários dos componentes numa forma anidra, ao tampão de reacção, antes ou durante a realização do ensaio, o mesmo sendo válido também para as substâncias calibradoras. As próprias amostras podem ser fornecidas numa forma anidra ou liofilizada e podem ser acrescentadas à mistura de reacção numa forma anídrica ou podem ser dissolvidas antes da sua utilização.

Em análises de química clínica a utilização de curvas padrão para efeitos de calibração é uma prática convencional. Assim, na execução do processo da presente invenção, é possível utilizar amostras com um teor conhecido em cistatina C em vez de amostras clínicas para se construir uma curva padrão para a resposta/sinal que se pretende medir e depois é possível calcular o teor em cistatina C de amostras desconhecidas por interpolação a partir da curva padrão.

A concentração total de nanopartículas - imunoconjugados na mistura irá ser seleccionada em conformidade com processos perfeitamente conhecidos na especialidade de imunoensaios por dispersão de luz melhorada por partículas, pelo que os valores de absorvência resultantes das referidas nanopartículas não irão influenciar as medições correctas e exactas, sendo todavia a concentração de micropartículas suficientemente elevada para se obter o desenvolvimento do sinal. Como é evidente a quantidade é influenciada por diversos parâmetros tais como o volume da amostra de fluido corporal

ou da amostra obtida a partir desta, e também vai depender do teor em cistatina C.

Como parâmetros típicos não limitativos de um ensaio é possível mencionar os a seguir indicados

O volume típico de uma amostra está compreendido entre 1 e 20 μL , por exemplo, entre 2 e 10 μL ou em particular 3 μL

O volume típico de imunopartículas está compreendido entre 10 e 100 μL ou entre 20 e 60 μL ou em particular 40 μL . As referidas micropartículas podem ser fornecidas sob a forma de uma suspensão contendo entre 0,5 e 10 ou entre 1 e 5, tipicamente cerca de 2 a 3, em particular 2,26 mg de partículas por ml de solução. O tampão pode ter um valor de pH compreendido entre 6 e 9, por exemplo entre 7 e 8,5 e tipicamente cerca de 8,4. A referida solução tampão pode conter, como suplemento da substância tampão, outros ingredientes, por exemplo, aminoácidos, sais, proteínas inertes e agentes emulsionantes ou solubilizadores, conforme definido anteriormente. Uma mistura típica de tais ingredientes e de tampão, é constituída por tampão borato 10 mM, glicina 10 mM, NaCl 15 mM contendo 0,25% de Tween 20 e albumina na concentração de 1 g/L.

Um volume total de ensaio típico está compreendido entre 100 e 1000 μL ou entre 200 e 500 μL ou entre 250 e 300 μL ou em particular é cerca de 280 μL .

Instrumentos diferentes trabalham com volumes totais diferentes pelo que 30% a 60% destes volumes ou 150% a 300% destes volumes são típicos para outros instrumentos. A proporção entre o volume da amostra e o volume de imunopartículas pode estar compreendido entre 1/100 e 2/3,

mais preferencialmente entre 2/100 e 1/3 e ainda mais preferencialmente entre 1/40 e 1/5.

f) Aplicações médicas

O processo de ensaio da presente invenção pode ser utilizado para diagnosticar e monitorizar estados patológicos ou potencialmente patológicos que estejam relacionados com o teor de cistatina C nos fluidos ou tecidos corporais ou que aí se manifeste. Em particular, refere-se a taxa de filtração glomerular (GFR, enquanto medição para a função renal) de um mamífero, ou os estados patológicos que afectem a referida velocidade de filtração.

O processo reivindicado pode ser utilizado para se determinar a GFR em crianças; ou para se determinar a GFR em pacientes com atrofia muscular; para supervisionar os efeitos da terapia contra o cancro na função renal; para supervisionar os transplantes renais e a terapia imunossupressora; para supervisionar a velocidade de filtração renal nos diabéticos; para a detecção e práticas necessárias em casos de eclampsia; e para se conseguir fazer uma dosagem correcta de fármacos nos casos em que a administração de fármacos esteja associada a uma diminuição de GFR de que possa resultar uma acumulação indesejada de fármacos no corpo.

O método de ensaio também pode ser utilizado para a avaliação dos efeitos de substâncias farmacêuticas sobre a referida velocidade de filtração.

Um leitor atento da presente memória descritiva pode inferir outras aplicações potenciais.

De acordo com um outro dos seus aspectos, a invenção proporciona um produto analítico, facultativamente em

formato de estojo ou em formato de estojo de componentes, utilizável para os ensaios de cistatina C numa amostra, compreendendo esse produto os componentes seguintes: pelo menos um tipo de nanopartículas - imunoconjugados, conforme descrito anteriormente, numa forma anidra ou em suspensão e facultativamente um ou vários constituintes suplementares, conforme aqui definidos, por exemplo, um tampão de ensaio adequado e facultativamente soluções calibradoras e soluções de referência.

A presente invenção proporciona também um conjunto de reagentes para a realização dos imunoenaios de acordo com a invenção. O conjunto de reagentes caracteriza-se pelo facto de compreender imunopartículas anti-cistatina C, um tampão de ensaio adequado e facultativamente soluções de calibragem e soluções de referência. Opcionalmente, a suspensão de partículas e o tampão de ensaio são fornecidos sob a forma de um reagente combinado.

A presente invenção proporciona também um conjunto de reagentes para a realização dos imunoenaios de acordo com a invenção. O conjunto de reagentes caracteriza-se pelo facto de compreender imunopartículas anti-cistatina C, um tampão de ensaio adequado e facultativamente soluções de calibragem e soluções de referência. Opcionalmente, a suspensão de partículas e o tampão de ensaio são fornecidos sob a forma de um reagente combinado.

Facultativamente, também podem estar presentes elementos necessários para a avaliação dos sinais, tais como dispositivos de cálculo que permitam correlacionar directamente a concentração observada de cistatina C com o parâmetro GFR.

Os exemplos subsequentes servem para ilustra melhor a invenção.

Parte experimental

Exemplo 1 de síntese: preparação de soro policlonal de aves e sua purificação por afinidade

a) Preparação de soro de aves

É possível recorrer ao protocolo a seguir indicado para se gerar anticorpos IgY policlonais contra a cistatina C humana.

Para cada experiência de imunização foram utilizadas entre duas e quatro galinhas. Efectuou-se a colheita de alguns ovos antes do início da imunização. Os IgY purificados a partir destes ovos irão servir como IgY de referência. Utilizou-se 100 µg de cistatina C humana altamente purificada (purificada a partir de urina de pacientes com proteinúria tubular) que foram emulsionados em tampão fosfato contendo adjuvante completo de Freund e injectou-se a emulsão nos músculos peitorais das galinhas. Repetiu-se esta injeção a cada quatro semanas. Decorridas dez semanas após o início das injeções efectuou-se uma colheita de ovos. Efectuou-se a separação das gemas desses ovos e isolou-se a fracção IgY a partir das gemas dos ovos, por precipitação com cloreto de amónio, de uma maneira convencional de acordo com processos da técnica anterior utilizados para o isolamento de anticorpos de ovos (ver, por exemplo, Larsson A, Baaloev R-M, Lindahl T e Forsberg P-O em Poultry Science 72:1807-1812, 1993).

b) Purificação de soro policlonal por afinidade

Efectuou-se a imobilização de 10 mg de cistatina C humana altamente purificada, numa coluna 'HITRAP NHS-Active HP' da Amersham Pharmacia Biotech, em conformidade com as instruções contidas no folheto da embalagem da coluna.

Diluiu-se a fracção de IgY isolada até à concentração de 2 mg/mL em soluto salino tamponado com fosfato. Fez-se passar 200 mL desta solução de IgY através da coluna, seguindo-se a aplicação de 50 µL de soluto salino tamponado com fosfato isento de IgY. A eluição dos anticorpos com afinidade específica para a cistatina C imobilizada foi feita com 35 mL de tampão citrato 0,1 M a pH = 3,2. Os anticorpos anti-cistatina C específicos resultantes da eluição foram submetidos a diálise em presença de soluto salino tamponado com fosfato e foram concentrados até 3 mg/mL utilizando o dispositivo de filtração por centrifugação 'Amicon Centircon' para um valor crítico da massa molecular igual a 30000 Dalton.

Exemplo 2 de síntese: preparação de anticorpos monoclonais anti-cistatina C humana

É possível efectuar a preparação de anticorpos monoclonais anti-cistatina C humana conforme a seguir se indica, recorrendo a processos perfeitamente conhecidos na especialidade, descritos, por exemplo, por Harlow et al., 1988, Secção 6 da obra "Antibodies: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Nova Iorque, EUA. Isolou-se PSA humano a partir de plasma seminal humano, conforme descrito por Sensabaugh et al., 1990, J. Urology 144, 1523.

Efectuou-se a imunização de murganhos a intervalos regulares com 4 injeções de 50 µg de cistatina C humana em

RAS (sistema adjuvante RIBI). Decorridos quatro meses após a primeira injeção, efectuou-se a fusão de linfócitos, isolados a partir do baço dos murganhos imunizados, com a linhagem de células de mieloma SP2/0-Ag14, utilizando o método do polietileno-glicol, conforme descrito por G. Galfre *et al.*, 1981, *Methods in Enzymology*, 73, 3-46.

Os hibridomas que segregam um anticorpo contra a cistatina C foram identificados mediante o recurso ao protocolo ELISA de pesquisa seguinte: efectuou-se o revestimento de placas de microtitulação com imunoglobulina de coelho anti-cistatina C humana; a cistatina C ligada a esta fase sólida ficou a incubar com os sobrenadantes das culturas do hibridoma. O anticorpo monoclonal ligado à cistatina C foi detectado utilizando anti-imunoglobulina de murganho conjugada com peroxidase.

É possível isolar várias centenas de hibridomas que segregam anticorpos contra diferentes epítomos de cistatina C humana. Os anticorpos monoclonais correspondentes são depois purificados por afinidade e podem ser caracterizados de forma mais minuciosa.

Efectuou-se a ligação dos epítomos e determinou-se a reactividade relativa dos anticorpos em termos das suas constantes de dissociação aparente, recorrendo à tecnologia dos biossensores 'BIAcore' (Pharmacia, Suécia). Esta tecnologia baseia-se na técnica da ressonância do plasmão da superfície (ver J. L. Daiss *et al.*, 1994. na obra "Methods: A Companion to Methods in Enzymology", 6, 143-156, Academic Press Inc., NI, EUA) e permite monitorizar a cinética e a estequiometria de reacções biomoleculares.

Partindo dos sobrenadantes das culturas de células, efectuou-se a ligação dos anticorpos monoclonais à

superfície dos biossensores por meio do anticorpo policlonal anti-Fc de murganho conjugado no coelho. Monitorizou-se a associação da cistatina C antigénica aos anticorpos monoclonais e a dissociação a partir deles. Os dados podem ser analisados recorrendo a aplicações informáticas de avaliação inerentes a BIA, com base no modelo de equilíbrio simples $A + B = AB$ (L. G. Fagerstam *et al.*, 1992, *Journal of Chromatography*, 597, 397-410). Os anticorpos podem ser então comparados em função das suas respectivas constantes de dissociação aparente. Deste modo, é possível utilizar anticorpos ou combinações convenientes para a preparação das imunopartículas da invenção.

Exemplo 3 de síntese: preparação de imunopartículas anti-cistatina C

a) Processo de acoplamento - procedimento convencional

(1) Tampões e reagentes

Tampão MES	0,01 M	pH 6
Tampão borato	0,05 M	pH 9,3
Tampão PBS	0,05 M	pH 7,2
Tampão de armazenagem	TRIS 0,05 M	pH 8,4; 1 g/L glicina, 1 g/L Tween 20; 2 g albumina A; 1 g/L transferrina
Anticorpo	Ac à escolha com uma concentração de 1,0 mg/mL em MES	
Látex clorometílico ultrapurificado	Tal como fornecido com 4% de sólidos	

Para se obter um sinal mais intenso a partir das partículas poliméricas, por mg de anticorpo, ajustou-se o valor do pH do tampão de acoplamento de uma maneira específica ao valor do pH dos anticorpos que se pretende

acoplar. Além disso, os anticorpos foram diluídos com albumina/transferrina antes do acoplamento (ver *infra*). Para se fazer o acoplamento escolheu-se um valor de pH meia unidade acima do valor de pH do anticorpo, quando foram utilizados anticorpos monoclonais. Os anticorpos policlonais têm um valor de pH bastante diverso e por esse motivo com anticorpos policlonais utilizou-se um valor de pH igual a 8,8. O pH escolhido foi obtido misturando os tampões PBS e borato supramencionados.

O procedimento convencional a seguir apresentado descreve em linhas gerais um processo simples de um só passo para o acoplamento, por adsorção física, de anticorpos ao clorometilo. O protocolo está concebido para um látex clorometílico de 1 μm com 1% de sólidos. A reacção pode ser facilmente ampliada ou reduzida à escala para responder a necessidades individuais. Por exemplo, no caso de serem utilizadas partículas com tamanhos diferentes, então as quantidades de anticorpos (Ac) podem ser calculadas do modo seguinte:

$$\text{Peso de AC} = (\text{peso de Ac para partículas de } 1 \mu\text{m}) / (\text{diâmetro das partículas, em } \mu\text{m})$$

(2) Preparação da suspensão de partículas de látex

1. Pipetar 2,5 mL (40 mg/mL) de microsferas de látex clorometílico e fazer a diluição com 10 mL de tampão MES.

2. Centrifugar a mistura para sedimentar as partículas: 3000 x G durante 20 minutos.

3. Remover o sobrenadante e redispersar a massa obtida em 10 mL de tampão MES.

4. Centrifugar novamente e remover o sobrenadante das partículas.

5. Recolocar a massa obtida em suspensão em 5 mL de tampão MES, garantindo que as partículas microséricas ficam totalmente em suspensão.

A suspensão de látex tem agora aproximadamente 2% de sólidos (isto é, ~20 mg/mL).

(3) Acoplamento

1. A 5 mL de uma solução de 1,5 mg de anticorpos, 3,75 mg de albumina e 7 mg de transferrina de bovino em tampão PBS/borato, ajustado para o valor adequado de pH (ver *supra*), acrescentou-se 5 mL do látex. Isto é menos do que o necessário para uma monocamada de anticorpos. Os anticorpos são mais reactivos com o látex do que a transferrina e a albumina e ligam-se mais ou menos quantitativamente ao látex, ficando a parte restante da superfície de látex saturada com albumina e/ou transferrina. Esta mistura também evita a agregação e proporciona uma boa hidrofiliabilidade das partículas. Também é possível misturar outras proteínas inertes com os anticorpos durante a conjugação, tais como a hemocianina dos moluscos gastrópodes, a haptoglobina e outras proteínas solúveis em água, sem nenhuma afinidade para com os anticorpos nem com a cistatina C.

2. Manter a incubar a mistura de látex-proteína, com agitação suave à temperatura ambiente de um dia para o outro.

3. Centrifugar para fazer a separação entre partículas de látex marcadas com as proteínas e as proteínas não ligadas.

4. Remover e conservar o sobrenadante para determinação das proteínas. Neste passo, o sobrenadante

pode ser conservado e pode ser feita uma determinação de proteínas. Qualquer quantidade residual de proteínas no sobrenadante pode ser subtraída à quantidade original acrescentada. Com a parte restante faz-se o revestimento das partículas. O único método para a determinação de proteínas, compatível com microsferas de látex, é o método associado ao estojo de determinação de proteínas 'Micro BCA' da Pierce.

5. Com a massa obtida preparar nova suspensão em 10 mL de PBS.

6. Centrifugar outra vez para sedimentar as partículas.

7. Repetir os passos 5 e 6 duas vezes mais, para um total de três lavagens.

8. Preparar nova suspensão com o látex final em 10 mL de tampão de armazenagem para se obter uma concentração final de 1% em sólidos. Guardar a 4°C até posterior utilização. Não congelar.

Utiliza-se glicina no tampão de armazenagem para ocupar todos os locais reactivos existentes na superfície das microsferas, que não tenham ficado recobertos com a proteína. Isto serve para reduzir a ligação não específica. Se desejado, para cumprir o mesmo objectivo é possível utilizar proteínas inertes, tais como albumina do soro de bovino (BSA) ou transferrina de bovino. O composto NaN_3 encontra-se presente como biocida. Se o látex se mantiver estéril, pode omitir-se o composto NaN_3 que não é compatível com culturas de células ou de tecidos.

b) Preparação de nanopartículas revestidas

Aplicou-se o procedimento convencional supramencionado a partículas de látex revestidas, com um diâmetro de 0,8 µm, para a preparação dos conjugados de nanopartículas da presente invenção. De acordo com a fórmula anterior, utilizou-se 24 mg de anticorpos e 65 mg de albumina para revestir 100 mg de partículas.

As referidas imunopartículas anti-cistatina C foram produzidas por acoplamento de anticorpos anti-cistatina C, com o número de catálogo A167 Cys-C-AF da 'Norwegian Antibodies AS', Noruega (os referidos anticorpos policlonais anti-cistatina C humana correspondem à fracção de imunoglobulina, purificada por afinidade, do conjunto das imunoglobulinas isoladas a partir dos ovos das falinhas imunizadas com cistatina C proveniente de pacientes com proteinúria tubular renal crónica; o processo de purificação por afinidade foi efectuado com cistatina C humana imobilizada), às partículas de látex activadas com clorometilo (0,08 µm, da 'Intefacial Dynamics Inc.', EUA, número de catálogo C37487). Para o referido acoplamento é possível praticar o protocolo "Coupling of Proteins to IDC Ultraclean Chloromethyl Latex", acessível em <http://www.idclatex.com/bodv-bqrounder-superactive-protocol-11.asp>.

Há partículas e protocolos de acoplamento alternativos que é possível encontrar nos websites da 'Interfacial Dynamics', 'Invitrogen' e 'Bangs Particles Inc.'.

As partículas obtidas são utilizadas sob a forma de uma suspensão de 2,26 mg de partículas por mL em tampão borato 10 mM contendo glicina 10 mM, NaCl 15 mM com 0,25% de Tween 20 e albumina na concentração de 1 g/L.

Exemplo 1 de ensaio: ensaio turbidimétrico de cistatina C à base de imunopartículas da presente invenção, em diferentes condições de ensaio

Prepara-se a suspensão de imunopartículas em conformidade com o exemplo 3 de síntese, tal como praticado nas experiências a seguir descritas.

Nas referidas experiências utilizou-se o tampão de ensaio otimizado a pH = 7,2 seguinte:

polietileno-glicol (Sigma) 22 g/L,
Tween 20 (Sigma) 3 g/L,
MOPS (Sigma) 9,4 g/L,
azida de sódio 2,7 g/L,
cloreto de sódio 27 g/L.

Misturou-se 3 µL de amostra com 250 µL de tampão de ensaio e deixou-se em repouso durante 300 segundos, seguindo-se a adição de 40 µL de suspensão de partículas e a subsequente mistura. Depois de efectuada a mistura, mediu-se a absorvência de luz por cm utilizando um espectrofotómetro 'Schimadzu UV 1601'.

Dependendo da concentração, da temperatura, do tempo decorrido após a adição da suspensão de imunopartículas e da duração da mistura e do comprimento de onda da luz utilizada no espectrofotómetro, obteve-se os resultados a seguir indicados (Unidades mAbs/cm = miliunidades de absorvência por cm da trajectória da luz).

a) Para um comprimento de onda de 546 nm a 37°C num período de ensaio de 260 segundos:

uma variação de absorvência de 33 mUnidades Abs para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio, de 88 mUnidades Abs para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio e de 194

mUnidades Abs para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio.

b) Para um comprimento de onda de 505 nm a 37°C num período de ensaio de 260 segundos:

uma variação de absorvência de 43 mUnidades Abs para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio, de 128 mUnidades Abs para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio e de 282 mUnidades Abs para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio.

c) Para um comprimento de onda de 570 nm a 37°C num período de ensaio de 260 segundos:

uma variação de absorvência de 24 mUnidades Abs para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio, de 65 mUnidades Abs para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio e de 148 mUnidades Abs para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio.

d) Para um comprimento de onda de 546 nm a 37°C num período de ensaio de 120 segundos:

uma variação de absorvência de 11 mUnidades Abs para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio, de 31 mUnidades Abs para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio e de 72 mUnidades Abs para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio.

e) Para um comprimento de onda de 546 nm a 37°C num período de ensaio de 40 segundos:

uma variação de absorvência de 4 mUnidades Abs para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio, de 11 mUnidades Abs para uma concentração de

19,8 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio e de 23 mUnidades Abs para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por L na mistura de ensaio.

Definiu-se o "tempo de ensaio" como sendo o número de segundos para se misturar as imunopartículas com a mistura de tampão de ensaio e de amostra, até à leitura de absorvência. As concentrações de cistatina C foram determinadas recorrendo aos métodos de referência nefelométricos 'ProSpec' da 'Dade-Behring', EUA, utilizando o produto com o número de catálogo 'OQNM13 N', Látex cistatina C.

Estes resultados, com um sinal turbidimétrico mais rápido e mais intenso, foram utilizados depois para se investigar o efeito de interferência provocado pelos triglicéridos, que constituem uma substância vulgar que interfere nos imunoensaios turbidimétricos, e a linearidade do método da invenção, comparativamente com o melhor método da técnica anterior. Tais experiências são descritas a seguir.

Exemplo 2 de ensaio: investigação da interferência dos triglicéridos numa medição de turvação de acordo com o método da invenção

A finalidade deste estudo consistiu em determinar se o processo da invenção é sensível a interferências com os triglicéridos (TG) existentes na amostra para ensaio. Sempre que os valores de interferência estavam abaixo de uma concentração predeterminada dos TG, efectuou-se um estudo de tipo dose/resposta para se demonstrar a relação entre a interferência e a concentração das substâncias possivelmente interferentes. O procedimento baseia-se nas

orientações de NCCLS "Interference testing in clinical chemistry; approved guideline", NCCLS, secção 6.1.2.

a) Equipamento

Instrumento: instrumento 'Hitachi 917' com acessórios convencionais, fornecido por Roche Diagnostics.

Regulação do instrumento Hitachi 917

- Volume do tampão de ensaio: 230 μ L
- Volume da amostra: 3 μ L
- Volume de imunopartículas: 40 μ L
- Volume de água: 20 μ L
- Comprimento de onda primário: 564 nm
- Comprimento de onda secundário: 700 nm
- Diluições de calibração: 0,055, 0,125, 0,250, 0,432, 0,667, 1,000
- Logit Log(4P)

b) Reagentes

Tampão de ensaio: polietileno-glicol (Sigma) 22 g/L, Tween 20 (Sigma) 3 g/L, MOPS (Sigma) 9,4 g/L, azida de sódio 2,7 g/L, cloreto de sódio 27 g/L, pH = 7,2.

Agente de calibração: um soro contendo 7,70 mg de cistatina C humana por litro, conforme determinado por um laboratório de referência, utilizando o método nefelométrico de 'Dade-Behring', realizado com o nefelómetro 'ProSpec'.

Imunopartículas: imunopartículas anti-cistatina C, preparadas em conformidade com o exemplo 2 de síntese anterior. As partículas foram utilizadas sob a forma de uma suspensão (2,26 mg de partículas por mL de suspensão) em tampão borato 10 mM, contendo glicina 10 mM, NaCl 15 mM com 0,25% de Tween 20 e albumina na concentração de 1 g/L.

c) Amostras

Soro 1: uma mistura de soros de origem humana com uma concentração de triglicéridos superior a 20 mmol/L.

Soro 2: uma mistura de soros de origem humana com uma concentração de triglicéridos inferior a 10 mmol/L.

Foram utilizadas estas duas amostras de soros para se preparar amostras com as concentrações desejadas de triglicéridos.

d) Determinação da concentração de cistatina C nas duas misturas de soros utilizadas

A concentração de cistatina C nas duas misturas de soros utilizadas foi medida em 10 provas replicadas.

Medição n°	Soro 1 (mg/L)	Soro 2 (mg/L)
1	0,87	3,12
2	0,86	3,10
3	0,85	3,20
4	0,87	3,22
5	0,87	3,18
6	0,87	3,18
7	0,85	3,16
8	0,84	3,21
9	0,85	3,18
10	0,86	3,25
Média (mg/L)	0,86	3,18
DP (mg/L)	0,011	0,045
CV (%)	1,3	1,4

Os valores médios foram considerados como valores da concentração de cistatina C nas referidas amostras de soro.

Considerou-se um intervalo máximo de variação de $\pm 5\%$ de interferência para valores superiores a 1 mg/L e um intervalo máximo de $\pm 7,5\%$ para valores inferiores a 1 mg/L de cistatina C, como sendo os intervalos máximos de interferência aceitáveis para os triglicéridos. As diferenças foram designadas por $d_{\text{máx}}$.

De acordo com as orientações gerais da NCCLS, o número de provas replicadas (n) necessárias para se efectuar a experiência no intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) e com uma eficiência de 95% ($\beta = 0,05$) num teste bilateral é o seguinte:

$$n = 2 \left[\frac{(1,960 + 1,645)s}{d_{\text{máx}}} \right]^2$$

em que s é a concentração exacta (em mg de cistatina C/L) da mistura de soros.

O cálculo do número mínimo de provas replicadas de acordo com as orientações gerais da NCCLS proporciona os resultados seguintes:

$$\text{Amostra pior: } n = 2 \left[\frac{(1,960 + 1,645)s}{d_{\text{máx}}} \right]^2 = 0,76$$

$$\text{Amostra melhor: } n = 2 \left[\frac{(1,960 + 1,645)s}{d_{\text{máx}}} \right]^2 = 2,08$$

Estes resultados demonstram que eram suficientes 3 provas replicadas.

e) Preparação de soro inoculado com triglicéridos

Preparou-se soro com triglicéridos na concentração aproximada de 20 mmol/L (amostra A de soro). Um laboratório independente determinou o teor em triglicéridos. Metade desta porção de soro foi inoculada com cistatina C

purificada proveniente de 'Scipac Ltd.' RU, daí resultando uma concentração de cistatina C superior a 3 mg/L. (Amostra B de soro).

Tratou-se metade das amostras A e B de soro por ultracentrifugação a 50000 r.p.m. durante 30 minutos numa ultracentrifugadora 'Beckman TL-100'. A porção límpida da amostra foi utilizada como amostra de referência e o volume foi corrigido para compensar o volume dos lípidos removidos. (Estas amostras foram designadas por amostras C e D de soro, respectivamente).

f) Ensaios analíticos

Foram preparadas 3 aliquotas de cada uma das misturas de amostras de base e de cada uma das amostras de referência A, B, C e D.

Efectuou-se, por ordem alternada, a calibração do instrumento em conformidade com as instruções, e os ensaios das misturas de amostras de base e das misturas das amostras de referência (amostras A, B, C e D).

Quando se observou interferência, preparou-se uma amostra de concentração média, a 50%, a partir das amostras a 0% e a 100%. A partir da amostra de concentração média e da amostra a 0% preparou-se uma amostra a 25%. A partir da amostra de concentração média e da amostra a 100% preparou-se uma amostra a 75%, misturando quantidades iguais de cada amostra. Efectuou-se a medição de n provas replicadas de todas elas, segundo uma ordem aleatória numa experiência com nova calibração.

Calculou-se a concentração média para a amostra a 0% e subtraiu-se a todos os outros resultados.

g) Resultados líquidos para análises de dados

g1) Amostras com elevada concentração de cistatina C

Amostra de referência			Amostra analisada	
C1		3,20	T1	3,24
C2		3,25	T2	3,29
C3		3,20	T3	3,24
Calcular valores estatísticos				
Amostra de referência			Amostra analisada	
Média	X =	3,22	X =	3,26
D.P.	D.P. =	0,029	D.P. =	0,029
CV	CV =	0,9 %	CV =	0,9 %
Calcular as diferenças				
Média das amostras analisadas - Média das amostras de referência = 3,26-3,22 = 0,04 mg/L				
Determinar o intervalo de confiança a 95 %				
Amostra de referência			Amostra analisada	
Variância	S ² =	8,4x10 ⁻⁴	S ² =	8,4x10 ⁻⁴
Variação média =			8,4x10 ⁻⁴	
Desvio padrão das amostras =			0,029	

(continuação)

Limite superior do intervalo de confiança	$(d_{obs} + z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{2S^2}{n}}) =$	0,04+0,046 = 0,086
	$(d_{obs} - z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{2S^2}{n}}) =$	
Amostra de referência		Amostra analisada
Limite inferior de intervalo de confiança		0,04-0,046 = 0,006

Conclusões
Uma vez que o limite aceitável de desvio de 0,16 mg/L está à direita do intervalo de confiança, podemos concluir que os TG, para uma concentração de 18 mmol/L, não interferem com o imunoensaio da cistatina C para uma concentração de cistatina C aproximadamente igual a 3 mg/L.

g2) Amostras com fraca concentração de cistatina C

Amostra de referência			Amostra analisada	
C1		0,83	T1	0,92
C2		0,83	T2	0,95
C3		0,80	T3	0,89
Calcular valores estatísticos				
Amostra de referência			Amostra analisada	
Média	X =	0,82	X =	0,92
D.P.	D.P. =	0,017	D.P. =	0,03
CV	CV =	2,1 %	CV =	3,3 %
Calcular as diferenças				
Média das amostras analisadas - Média das amostras de referência = 0,92-0,82 = 0,10 mg/L				
Determinar o intervalo de confiança a 95%				

(continuação)

Amostra de referência			Amostra analisada	
Variância	S ² =	2,89x10 ⁻⁴	S ² =	9,0x10 ⁻⁴
Variação média =			5,95x10 ⁻⁴	
Desvio padrão das amostras =			0,024	
Limite superior do intervalo de confiança			0,10+0,038 = 0,138	
$\left(d_{obs} + z_{\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{2S^2}{n}} \right) =$				
Limite inferior de intervalo de			0,10-0,038 = 0,062	

<p>confiança</p> $\left(d_{\text{obs}} - z \frac{s}{\sqrt{n}}\right) =$	
<p>Conclusões</p>	
<p>Uma vez que o limite aceitável de desvio de 0,065 mg/L está dentro do intervalo de confiança, podemos concluir que os TG, para uma concentração de 18 mmol/L, não interferem com o imunoensaio da cistatina C da presente invenção para uma concentração de cistatina C aproximadamente igual a 1 mg/L.</p>	

De acordo com as condições experimentais especificadas, verificou-se que os TG, para concentrações inferiores a 18 mmol/L, não interferem com o imunoensaio de cistatina C da presente invenção.

Por tal motivo é possível concluir que a presente invenção proporciona um processo turbidimétrico de imunoensaios para a cistatina C, caracterizado pelo facto de a interferência provocada pelos triglicéridos numa concentração de 15 mmol/L na amostra analisada ser igual ou inferior a 5% no valor medido da cistatina C com uma concentração de 3,2 ou de 0,83 mg de cistatina C por litro.

Exemplo 3 de ensaio: determinação da interferência provocado pelos TG num ensaio de acordo com a técnica anterior

Efectuou-se uma investigação correspondente utilizando o instrumento 'Hitachi 917' e os reagentes da técnica anterior ('Dako Cytomation').

a) Reagentes

Imunopartículas: LX002/EFG/CS/25.10.04

Agente de calibração: X0974/EFG/SUM/09.09.04

Conjunto de referência: X0973/EFG/SUM/09.09.04

Tampão de reacção 9: S2361/EFG/KGR/09.07.03.

b) Resultados

b1) Amostras com concentração elevada de cistatina C, reagentes da técnica anterior

Amostra de referência			Amostra analisada	
C1		2,90	T1	3,06
C2		2,83	T2	3,11
C3		2,90	T3	3,09
Calcular valores estatísticos				
Amostra de referência			Amostra analisada	
Média	X =	2,88	X =	3,09
D.P.	D.P. =	0,0404	D.P. =	0,025
CV	CV =	1,4 %	CV =	0,008

(continuação)

Calcular as diferenças				
Média das amostras analisadas - Média das amostras de referência = $3,09 - 2,88 = 0,21$ mg/L				
Determinar o intervalo de confiança a 95%				
Amostra de referência			Amostra analisada	
Variância	$S^2 =$	$1,63 \times 10^{-3}$	$S^2 =$	$6,25 \times 10^{-4}$
Amostra de referência			Amostra analisada	

Variação média =	$1,13 \times 10^{-3}$
Desvio padrão das amostras =	0,034
Limite superior do intervalo de confiança $(d_{obs} + z_{\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{2S^2}{n}}) =$	$0,21 + 0,054 = 0,264$
Limite inferior de intervalo de confiança $(d_{obs} - z_{\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{2S^2}{n}}) =$	$0,21 - 0,054 = 0,156$
Conclusões	
Uma vez que o limite aceitável de desvio de 0,14 mg/L está à esquerda do intervalo de confiança, podemos concluir que os TG, para uma concentração de 18 mmol/L, interferem com um imunoenensaio de cistatina C 'Dako' para uma concentração de cistatina C aproximadamente igual a 3 mg/L.	

b2) Amostras com baixa concentração de cistatina C, reagentes da técnica anterior

Amostra de referência			Amostra analisada	
C1		0,62	T1	0,53
C2		0,64	T2	0,56
C3		0,62	T3	0,60
Calcular valores estatísticos				
Amostra de referência			Amostra analisada	
Média	X =	0,63	X =	0,56
D.P.	D.P. =	0,0115	D.P. =	0,035
CV	CV =	1,8 %	CV =	6,27 %
Calcular as diferenças				

Média das amostras analisadas - Média das amostras de referência = 0,62-0,56 = 0,06 mg/L			
Determinar o intervalo de confiança a 95%			
Amostra de referência		Amostra analisada	
Variância $S^2 =$	$1,32 \times 10^{-4}$	$S^2 =$	$1,23 \times 10^{-3}$
Amostra de referência		Amostra analisada	
Varição média =		$6,81 \times 10^{-4}$	
Desvio padrão das amostras =		0,026	
Limite superior do intervalo de confiança		$0,06 + 0,042 = 0,102$	
$(d_{obs} + z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{2S^2}{n}}) =$			
Limite inferior de intervalo de confiança		$0,06 - 0,042 = 0,018$	
$(d_{obs} - z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{2S^2}{n}}) =$			
Conclusões:			
uma vez que o limite aceitável de desvio de 0,047 mg/L está dentro do intervalo de confiança, podemos concluir que os TG, para uma concentração de 18 mmol/L, não interferem com o imunoensaio de cistatina C 'Dako' para uma concentração de cistatina C aproximadamente igual a 1 mg/L.			

A partir dos quadros anteriores é possível concluir que o processo da presente invenção é mais fiável contra interferências provocadas por triglicéridos.

Exemplo 4 de ensaio: investigação da linearidade utilizando o processo da presente invenção

Esta investigação foi realizada em conformidade com o protocolo EP6-A EP6-A, vol. 23, No 16, da NCCLS.

Nesta experiência investigou-se a linearidade do imunoensaio da cistatina C de acordo com a presente

invenção. Isto foi feito utilizando 3 amostras diferentes de soro com elevada concentração que foram diluídas com uma amostra de soro com baixa concentração, entre 0-100%. Traçando um gráfico dos resultados das séries de diluições e estudando o gráfico com recurso às análises de regressão de primeira, segunda e terceira ordens concluiu-se que o processo de imunoensaio da cistatina C da presente invenção foi linear de acordo com os critérios dados. Os critérios consistiram em examinar e comparar os parâmetros do gráfico por meio de um teste t de student para se verificar se os pontos de medição (marcados no gráfico em função do facto de diluição) se poderiam ajustar a um polinómio de segunda ou de terceira ordem melhor do que a um polinómio de primeira ordem. Falhando o teste t, aceitou-se uma diferença de 6% entre o polinómio de primeira ordem e os polinómios de ordem superior, com o valor mais baixo do chi quadrado comutado com o valor médio medido para cada concentração (excepto nos pontos extremos, em que se aceitou uma diferença até 25% devido ao facto de ninguém raramente ou mesmo nunca medir amostras com concentrações de cistatina C nesta zona). De acordo com estes critérios, o processo de imunoensaios de cistatina C da presente invenção é linear no sistema de medição com o aparelho Hitachi 911.

a) Instrumentos

Utilizou-se um instrumento Hitachi 911.

b) Reagentes

Utilizou-se o tampão de ensaio, o agente de calibração de cistatina C e as imunopartículas anti-cistatina C descritos anteriormente.

c) Amostras

Foram utilizadas 3 amostras diferentes de soro dos pacientes, A, B e C, em que todas as amostras tinham valores de concentração de cistatina C superiores a 6 mg/L.

Como diluente dos soros de elevada concentração utilizou-se uma amostra de soro de um paciente, a D, com uma baixa concentração de cistatina C, inferior a 0,8 mg/L.

Efectuou-se a preparação de séries de diluições de amostra de plasma, A, B e C, conforme descrito no quadro 1 para a amostra A. Cada uma das amostras A, B e C foi diluída 10 vezes, desde 100% até 0% da concentração original, com a amostra D de baixa concentração, significando 100% um soro puro de elevada concentração (A_{100} , B_{100} , C_{100}) e significando 0% soro puro de baixa concentração (D_{100}).

Quadro 1: quadro de diluição para a amostra A de soro

ID da amostra	Factor de diluição	Volume de solução a 100 %, A_{100} (uL)	Volume de solução a 0 %, D_{100} (uL)
A1	1	1000	0
A2	0,9	900	100
A3	0,8	800	200
A4	0,7	700	300
A5	0,6	600	400

A6	0,5	500	500
A7	0,4	400	600
A8	0,3	300	700
A9	0,2	200	800
A10	0,1	100	900
A11	0	0	1000

Foi feita a mesma série de diluições para a amostra B e para a amostra C, conforme descrito no quadro 1.

Efectuou-se uma calibração do aparelho Hitachi 911 para se definir uma curva padrão, utilizando os parâmetros de ensaio seguintes:

- volume a analisar: 230 μ L
- volume da amostra: 3 μ L
- volume das imunopartículas: 40 μ L
- volume de água: 10 μ L

Para cada uma das amostras diluídas foram efectuadas 3 medições e efectuou-se o registo dos resultados obtidos com cada amostra A, B e C.

d) Resultados

d1) Análise de regressão

Quadro 1: dados não processados do soro 1

Diluição	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Medição 1 (mg/L)	0,81	1,5	2,19	3,01	3,97	4,73	5,5	6,56	7,25	7,94	8,44
Medição 2 (mg/L)	0,77	1,5	2,16	2,95	3,67	4,75	5,62	6,23	7,23	7,88	8,45
Medição 3 (mg/L)	0,76	1,53	2,17	2,85	3,82	4,63	5,48	6,09	6,98	7,73	8,2
Média (mg/L)	0,78	1,51	2,17	2,94	3,82	4,7	5,53	6,29	7,15	7,85	8,36
D.P. (mg/L)	0,015	0,017	0,015	0,081	0,15	0,064	0,076	0,24	0,15	0,11	0,14
CV (%)	1,9	1,13	0,7	2,8	3,9	1,4	1,4	3,8	2,1	1,4	1,7

Preferência de baixa concentração (mg/L)	1,40										
Preferência de alta concentração (mg/L)	3,62										

Quadro 2: dados não processados do soro 2

Diluição	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Medição 1 (mg/L)	0,6	1,34	1,8	2,41	3,1	3,59	4,21	4,76	5,28	5,82	6,35
Medição 2 (mg/L)	0,64	1,3	1,76	2,36	2,93	3,54	4,01	4,77	5,24	5,96	6,37
Medição 3 (mg/L)	0,57	1,29	1,84	2,3	2,85	3,51	3,87	4,79	5,26	5,84	6,32
Média (mg/L)	0,6	1,31	1,8	2,36	2,96	3,55	4,03	4,77	5,26	5,87	6,35
D.P. (mg/L)	0,035	0,026	0,04	0,055	0,13	0,04	0,17	0,015	0,02	0,076	0,025
CV (%)	5,8	2	2,2	2,3	4,4	1,1	4,2	0,3	0,4	1,3	0,4
Preferência de baixa concentração (mg/L)	1,47										
Preferência de alta concentração (mg/L)	3,74										

Quadro 3: dados não processados do soro 3

Diluição	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Medição 1 (mg/L)	0,78	1,43	2,06	2,65	3,46	4	4,82	5,65	6,16	7,05	7,56
Medição 2 (mg/L)	0,67	1,41	2,07	2,75	3,31	3,99	4,92	5,63	6,29	6,89	7,47
Medição 3 (mg/L)	0,73	1,4	2,01	2,66	3,21	4,14	4,75	5,46	6,14	6,74	7,51
Média (mg/L)	0,73	1,41	2,05	2,69	3,33	4,04	4,83	5,58	6,2	6,89	7,51
D.P. (mg/L)	0,055	0,015	0,032	0,055	0,13	0,084	0,085	0,1	0,081	0,16	0,045
CV (%)	7,5	1,1	1,6	2,04	3,9	2,08	1,8	1,8	1,3	2,3	0,6

Preferência de baixa concentração (mg/L)	1,46										
Preferência de alta concentração (mg/L)	3,60										

Nas figuras 1, 2 e 3 estão representados gráficos dos valores médios medidos em função do factor de diluição para a totalidade dos 3 soros com análise de regressão.

d2) Teste t de student

Realizou-se um teste t de student para se confirmar se os parâmetros de regressão de ordem mais elevada se ajustavam aos dados. Os resultados estão transpostos para o quadro 4.

Quadro 4: valores do teste t de student

	Soro 1	Soro 2	Soro 3
Coeficiente de segunda ordem do valor t calculado no polinómio de segunda ordem	t = 0,302/0,416 = 0,73	t = 0,107/0,200 = 0,535	t = 0,197/0,211 = 0,93
Coeficiente de segunda ordem do valor t calculado no polinómio de terceira ordem	t = 5,87/0,87 = 6,75	t = 0,298/1,207 = 0,25	t = 2,60/0,89 = 2,92
Coeficiente de terceira ordem do valor t calculado no polinómio de terceira ordem	t = 4,11/0,57 = 7,21	t = 0,270/0,792 = 0,34	t = 1,60/0,59 = 2,71
Valor t tabelado para o polinómio de segunda ordem com df = 30 e $\alpha = 0,05/2$	2,042	2,042	2,042

	Soro 1	Soro 2	Soro 3
(teste bilateral)			
Valor t tabelado para o polinómio de segunda ordem com $df = 29$ e $\alpha = 0,05/2$ (teste bilateral)	2,045	2,045	2,045

Soro 1

A partir do quadro 4 concluímos que os dados obtidos com o soro 1 não se ajustam a um polinómio de segunda ordem, uma vez que o valor t calculado é inferior ao valor t tabelado.

A partir do quadro 4 concluímos que o conjunto de dados pode eventualmente ajustar-se a um polinómio de ordem superior e necessitámos de confirmar se a diferença entre o polinómio de primeira ordem e o polinómio de ordem superior com o valor mais baixo do chi quadrado era superior a 6%. O polinómio de terceira ordem possui o valor mais baixo do chi quadrado,

$$DL = P(x) - L(x)$$

em que $P(x)$ é uma equação polinomial e $L(x)$ é a equação linear.

Quadro 5: cálculos de DL(%) para o soro 1

Valores médios medidos (mg/L)	Valores calculados com o polinómio de 3ª ordem a partir da equação	Valores calculados com o polinómio de 1ª ordem a partir da equação	Diferença absoluta DL = $P3(x) - L(x)$	Diferença de DL % = $DL / (\text{valor médio medido}) \times 100$
	$P3(x) = 0,811 + 6,821x + 8,872x^2 + 1,16x^3$	$L(x) = 0,709 + 7,874x$		

0,780	0,811	0,709	0,102	13,1
1,51	1,45	1,50	-0,0487	-3,22
2,17	2,18	2,28	-0,107	-4,91
2,94	2,97	3,07	-0,0966	-3,28
3,82	3,82	3,86	-0,0431	-1,13
4,70	4,68	4,65	0,0290	0,617
5,53	5,53	5,43	0,0951	1,72
6,29	6,35	6,22	0,130	2,07
7,15	7,12	7,01	0,110	1,54
7,85	7,81	7,80	0,0101	0,128
8,36	8,39	8,58	-0,195	-2,33

Na figura 4 está ilustrado o gráfico de DL (%) para o soro 1.

Soro 2

A partir do quadro 4 concluímos que os dados obtidos com o soro 2 não se ajustam a um polinómio de segunda ordem, uma vez que o valor t calculado é inferior ao valor t tabelado.

A partir deste resultados concluímos que o conjunto de dados obtidos com o soro 2 não se ajusta a um polinómio de terceira ordem, uma vez que o valor t calculado é inferior ao valor t tabelado e a série de diluição é considerada linear.

Soro 3

A partir do quadro 4 concluímos que os dados obtidos com o soro 3 não se ajustam a um polinómio de segunda ordem, uma vez que o valor t calculado é inferior ao valor t tabelado.

A partir do quadro 4 concluímos que o conjunto de dados pode eventualmente ajustar-se a um polinómio de ordem superior e necessitámos de confirmar se a diferença entre o polinómio de primeira ordem e o polinómio de ordem superior com o valor mais baixo do chi quadrado era superior a 5% (DL). O polinómio de terceira ordem possui o valor mais baixo do chi quadrado,

$$DL = P(x) - L(x)$$

em que $P(x)$ é uma equação polinomial e $L(x)$ é a equação linear.

Quadro 6: cálculos de DL(%) para o soro 3

Valores médios medidos (mg/L)	Valores calculados com o polinómio de 3ª ordem a partir da equação (mg/L): $P_3(x)=0,768+5,755x+2,601x^2-1,603x^3$	Valores calculados com o polinómio de 1ª ordem a partir da equação (mg/L): $L(x)=0,680+5,865x$	Diferença absoluta DL = $P_3(x)-L(x)$	Diferença de DL % = DL/(valor médio medido) x 100
0,730	0,768	0,680	0,0880	12,1
1,41	1,37	1,37	0,001111	0,0785
2,05	2,01	2,05	-0,0434	-2,12
2,69	2,69	2,74	-0,0551	-2,05
3,33	3,38	3,43	-0,0436	-1,31
4,04	4,10	4,11	-0,0186	-0,461
4,83	4,81	4,80	0,0103	0,214
5,58	5,52	5,49	0,0336	0,601
6,20	6,22	6,17	0,0415	0,669
6,89	6,89	6,86	0,0245	0,356
7,51	7,52	7,55	-0,0270	-0,360

Na figura 5 está representado um gráfico de DL (%) para o soro 3.

A partir dos cálculos anteriores e tendo em conta o conjunto de especificações para se concluir sobre linearidade, verificou-se que o imunoensaio de cistatina C

da presente invenção é linear no intervalo experimentado compreendido aproximadamente entre 0,6-8,5 mg/L.

Uma vez que o intervalo de referência está contido neste domínio de variação e tendo em conta que é ainda necessário medir as concentrações de cistatina C acima de 8 mg/L, o intervalo de variação linear documento é suficiente para todos os fins clínicos de imunoenaios de cistatina C segundo o processo da presente invenção.

A partir deste estudo é possível concluir que o processo turbidimétrico de imunoenaios para cistatina C de acordo com a presente invenção, se caracteriza pelo facto de apresentar um desvio em relação à linearidade inferior a 4% num intervalo de medição compreendido entre 1,32 e 7,5 mg de cistatina C por litro e um desvio em relação à linearidade inferior a 15% num intervalo de medição compreendido entre 0,75 e 7,5 mg de cistatina C por litro.

Exemplo 5 de ensaio: investigação da linearidade utilizando o processo de acordo com a presente invenção

Esta investigação foi realizada em conformidade com o protocolo EP6-A EP6-A, vol. 23, No 16, da NCCLS.

Nesta experiência investigou-se a linearidade do imunoensaio da cistatina C de acordo com a presente invenção. Isto foi feito diluindo uma amostra de soro com elevada concentração com uma amostra de soro com baixa concentração, entre 0-100%. Traçando um gráfico dos resultados das séries de diluições e estudando o gráfico com recurso às análises de regressão de primeira, segunda e terceira ordens concluiu-se que o processo de imunoensaio da cistatina C da presente invenção foi linear de acordo com os critérios dados. Os critérios consistiram em

examinar e comparar os parâmetros do gráfico por meio de um teste t de student para se verificar se os pontos de medição (marcados no gráfico em função do facto de diluição) se poderiam ajustar a um polinómio de segunda ou de terceira ordem melhor do que a um polinómio de primeira ordem. Falhando o teste t, aceitou-se uma diferença de 6% entre o polinómio de primeira ordem e os polinómios de ordem superior, com o valor mais baixo do chi quadrado comutado com o valor médio medido para cada concentração (excepto nos pontos extremos, em que se aceitou uma diferença até 25% devido ao facto de ninguém raramente ou mesmo nunca medir amostras com concentrações de cistatina C nesta zona). De acordo com estes critérios, o processo de imunoensaios de cistatina C da presente invenção é linear no sistema de medição com o aparelho Architect ci8200.

a) Instrumentos

Utilizou-se um instrumento Architect ci8200.

b) Reagentes

Utilizou-se o tampão de ensaio, o agente de calibração de cistatina C e as imunopartículas anti-cistatina C descritos anteriormente.

c) Amostras

Foi utilizada uma amostra de soro de um paciente, A, que contém concentrações de cistatina C superiores a 6 mg/L. Como diluente do soro com elevada concentração utilizou-se uma amostra de soro de um paciente, D, com uma baixa concentração de cistatina C, inferior a 0,8 mg/L.

Efectuou-se a série de diluições da amostra A de plasma conforme descrito no quadro 1. Diluiu-se a amostra 10 vezes, desde 100% até 0% da concentração original com a amostra D de baixa concentração, em que 100% corresponde ao soro puro com a concentração elevada (A_{100}) e 0% corresponde ao soro puro de baixa concentração (D_{100}).

Quadro 7: quadro de diluição para a amostra A de soro

ID da amostra	Factor de diluição	Volume de solução a 100 %, A_{100} (uL)	Volume de solução a 0 %, D_{100} (uL)
A1	1	1000	0
A2	0,9	900	100
A3	0,8	800	200
A4	0,7	700	300
A5	0,6	600	400
A6	0,5	500	500
A7	0,4	400	600
A8	0,3	300	700
A9	0,2	200	800
A10	0,1	100	900
A11	0	0	1000

Efectuou-se uma calibração do aparelho Architect ci8200 para se definir uma curva padrão, utilizando os parâmetros de ensaio seguintes:

- volume a analisar: 220 μ L
- volume da amostra: 3 μ L
- volume das imunopartículas: 45 μ L

Para cada uma das amostras diluídas foram efectuadas 3 medições e efectuou-se o registo dos resultados obtidos com a amostra A.

d) Resultados

d1) Análise de regressão

Quadro 8: dados não processados do soro A

Diluição	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Medição 1 (mg/L)	0,63	1,58	2,45	3,36	4,25	5,31	6,36	7,38	8,12	8,77	muito alto
Medição 2 (mg/L)	0,64	1,59	2,47	3,37	4,35	5,36	6,31	7,33	8,15	8,71	muito alto
Medição 3 (mg/L)	0,62	1,59	2,48	3,33	4,27	5,38	6,32	7,35	8,16	8,83	muito alto
Média (mg/L)	0,63	1,59	2,47	3,35	4,29	5,35	6,33	7,35	8,14	8,77	muito alto
D.P. (mg/L)	0,01	0,006	0,015	0,021	0,053	0,036	0,026	0,025	0,021	0,060	ND
CV (%)	1,59	0,36	0,62	0,62	1,23	0,67	0,42	0,34	0,26	0,68	
Preferência de baixa concentração (mg/L)	0,88										
Preferência de alta concentração (mg/L)	3,63										

Nas figuras 6, 7 e 8 estão representados gráficos dos valores médios medidos em função do factor de diluição para o soro A, com análise de regressão.

d2) Teste t de student

Quadro 9: valores do teste t de student

	Soro A
Coeficiente de segunda ordem do valor t calculado no polinómio de segunda ordem	t = 0,591/0,548 = 1,078

Coeficiente de segunda ordem do valor t calculado no polinómio de terceira ordem	$t = 6,15/1,86 = 3,31$
Coeficiente de terceira ordem do valor t calculado no polinómio de terceira ordem	$t = 4,99/1,35 = 3,69$
Valor t tabelado para o polinómio de segunda ordem com $df = 30$ e $\alpha = 0,05/2$ (teste bilateral)	2,042
Valor t tabelado para o polinómio de segunda ordem com $df = 29$ e $\alpha = 0,05/2$ (teste bilateral)	2,045

Soro A

A partir do quadro 9 concluímos que os dados obtidos com o soro A não se ajustam a um polinómio de segunda ordem, uma vez que o valor t calculado é inferior ao valor t tabelado.

A partir do quadro 9 concluímos que o conjunto de dados pode eventualmente ajustar-se a um polinómio de ordem superior e necessitámos de confirmar se a diferença entre o polinómio de primeira ordem e o polinómio de ordem superior com o valor mais baixo do chi quadrado era superior a 6%. O polinómio de terceira ordem possui o valor mais baixo do chi quadrado,

$$DL = P(x) - L(x)$$

em que $P(x)$ é uma equação polinomial e $L(x)$ é a equação linear.

Quadro 10: cálculos de DL(%)

Valores médios medidos (mg/L)	Valores calculados com o polinómio de 3ª ordem a partir da equação:	Valores calculados com o polinómio de 1ª ordem a partir da equação:	Diferença absoluta DL = $P3(x) - L(x)$	Diferença de DL % = $DL / (\text{valor médio medido}) \times 100$
	$P3(x) = 0,888 + 7,53x + 6,15x^2 - 4,99x^3$	$L(x) = 0,64 + 9,30x$		

0,630	0,695	0,640	0,0550	-8,73
1,59	1,50	1,57	0,0657	4,13
2,47	2,41	2,50	0,0932	3,77
3,35	3,37	3,43	0,0576	1,72
4,29	4,37	4,36	0,0111	-0,259
5,35	5,37	5,29	0,0830	-1,55
6,33	6,35	6,22	0,128	-2,02
7,35	7,27	7,15	0,116	-1,58
8,14	8,10	8,08	0,0180	-0,221
8,77	8,82	9,01	0,197	2,25

A partir dos cálculos anteriores e tendo em conta o conjunto de especificações para se concluir sobre linearidade, verificou-se que o imunoensaio de cistatina C da presente invenção é linear no intervalo experimentado compreendido aproximadamente entre 0,6-8,8 mg/L.

Uma vez que o intervalo de referência está contido neste domínio de variação e tendo em conta que é ainda necessário medir as concentrações de cistatina C acima de 8 mg/L, o intervalo de variação linear documentado é suficiente para todos os fins clínicos de imunoensaios de cistatina C segundo o processo da presente invenção.

A partir deste estudo é possível concluir que o processo turbidimétrico de imunoensaios para cistatina C de acordo com a presente invenção, se caracteriza pelo facto de apresentar um desvio em relação à linearidade inferior a 4% num intervalo de medição compreendido entre 1,32 e 7,5 mg de cistatina C por litro e um desvio em relação à linearidade inferior a 15% num intervalo de medição compreendido entre 0,75 e 7,5 mg de cistatina C por litro.

Exemplo 6 de ensaio: investigação de linearidade num ensaio turbidimétrico da técnica anterior

a) Ensaio

Efectuou-se um estudo correspondente ao exemplo 4 de ensaio, utilizando o processo e os preceitos da técnica anterior, em conformidade com a metodologia de ensaio "Cystatin C - The marker of choice for renal function testing", da autoria de Camilla Schmidt cujo texto está publicado em European Clinical Laboratory, de 10 de Fevereiro de 2004, e também no folheto da embalagem dos produtos 'Dako' indicados no referido artigo, tendo sido obtidos os resultados a seguir indicados.

b) Resultados

b1) Análise de regressão

Nas figuras 10, 11 e 12 estão representados os gráficos dos valores médios medidos em função do facto de diluição para a totalidade dos três soros A, B e C, com análises de regressão.

b2) Teste t de student

Realizou-se um teste t de student para se confirmar se os parâmetros de regressão de ordem mais elevada se ajustavam aos dados. Os resultados estão transpostos para o quadro 11.

Quadro 11: valores do teste t de student

	Soro 1	Soro 2	Soro 3
Coeficiente de segunda ordem do valor t calculado no polinómio de segunda ordem	t = 1,51/0,186 = 8,11	t = 0,235/0,129 = 2,52	t = 1,67/0,12 = 13,91
Coeficiente de segunda	t =	t = 0,25/0,75	t =

ordem do valor t calculado no polinómio de terceira ordem	$3,796/0,709 = 5,35$	$= 0,33$	$2,10/0,68 = 3,09$
Coefficiente de terceira ordem do valor t calculado no polinómio de terceira ordem	$t = 1,52/0,465 = 3,27$	$t = 0,48/0,39 = 1,23$	$t = 0,29/0,45 = 0,64$
Valor t tabelado para o polinómio de segunda ordem com $df = 30$ e $\alpha = 0,05/2$ (teste bilateral)	2,042	2,042	2,042
Valor t tabelado para o polinómio de segunda ordem com $df = 29$ e $\alpha = 0,05/2$ (teste bilateral)	2,045	2,045	2,045

SORO 1

O conjunto de dados pode eventualmente ajustar-se a um polinómio de ordem superior e é necessário comparar a diferença entre o polinómio de primeira ordem e o polinómio de ordem superior com o valor mais baixo de chi quadrado para se verificar se é superior a 6% (DL). O polinómio de terceira ordem possui o valor mais baixo de chi quadrado. As diferenças (DL) são:

Quadro 12: cálculos de DL(%)

Valores médios medidos (mg/L)	Valores calculados com o polinómio de 3ª ordem a partir da equação: $P3(x) = 0,659 + 5,051x + 3,798x^2 - 1,521x^3$	Valores calculados com o polinómio de 1ª ordem a partir da equação: $L(x) = 0,377 + 7,436x$	Diferença absoluta DL = $P3(x) - L(x)$	Diferença de DL % = $DL / (\text{valor médio medido}) \times 100$
0,633	0,659	0,377	0,282	44,5

1,24	1,20	1,12	0,0799	6,45
1,82	1,81	1,86	-0,0553	-3,04
2,45	2,47	2,61	-0,133	-5,43
3,20	3,19	3,35	-0,162	-5,06
3,93	3,94	4,09	-0,152	-3,86
4,70	4,73	4,84	-0,111	-2,36
5,57	5,53	5,58	-0,0492	-0,883
6,32	6,35	6,33	0,0247	0,391
7,22	7,17	7,07	1,101	1,41
7,96	7,99	7,81	0,172	2,16

Na figura 13 está representado o gráfico das diferenças DL (%) para o soro 1.

SORO 2

O conjunto de dados pode eventualmente ajustar-se a um polinómio de ordem superior e é necessário comparar a diferença entre o polinómio de primeira ordem e o polinómio de ordem superior com o valor mais baixo de chi quadrado para se verificar se é superior a 6% (DL). O polinómio de terceira ordem possui o valor mais baixo de chi quadrado. As diferenças (DL) são:

Quadro 13: cálculos de DL(%)

Valores médios medidos (mg/L)	Valores calculados com o polinómio de 3ª ordem a partir da equação (mg/L): $P3(x)=0,516+4,703x-0,246x^2+0,381x^3$	Valores calculados com o polinómio de 1ª ordem a partir da equação (mg/L): $L(x)=0,480+4,81x$	Diferença absoluta DL = $P3(x)-L(x)$	Diferença de DL % = DL/(valor médio medido) x 100
0,480	0,516	0,480	0,0360	7,50

1,04	0,984	0,961	0,0232	2,23
1,45	1,45	1,44	0,00781	0,538
1,91	1,92	1,92	-0,00795	-0,416
2,37	2,38	2,40	-0,0218	-0,919
2,86	2,85	2,88	-0,0314	-1,10
3,28	3,33	3,37	-0,0345	-1,05
3,83	3,82	3,85	-0,0288	-0,751
4,33	4,32	4,33	-0,0120	-0,276
4,87	4,83	4,81	0,0182	0,373
5,32	5,35	5,29	0,0640	1,20

Na figura 14 está representado o gráfico das diferenças DL (%) para o soro 2.

SORO 3

Significa isto que o conjunto de dados pode ajustar-se a um polinómio de ordem superior e é necessário comparar a diferença entre o polinómio de primeira ordem e o polinómio de ordem superior com o valor mais baixo de chi quadrado para se verificar se é superior a 6% (DL). O polinómio de terceira ordem possui o valor mais baixo de chi quadrado. As diferenças (DL) são:

Quadro 14: cálculos de DL(%)

Valores médios medidos (mg/L)	Valores calculados com o polinómio de 3ª ordem a partir da equação (mg/L): $P_3(x)=0,623+5,032x+7,138x^2+0,287x^3$	Valores calculados com o polinómio de 1ª ordem a partir da equação (mg/L): $L(x)=0,363+6,866x$	Diferença absoluta DL = $P_3(x)-L(x)$	Diferença de DL % = $DL/(\text{valor médio medido}) \times 100$
0,610	0,623	0,363	0,260	42,6

1,15	1,15	1,05	0,0973	8,46
1,74	1,71	1,74	-0,0251	-1,44
2,32	2,31	2,42	-0,109	-4,70
2,95	2,95	3,11	-0,156	-5,29
3,61	3,63	3,80	-0,168	-4,65
4,29	4,34	4,48	-0,146	-3,41
5,12	5,08	5,17	-0,0932	-1,82
5,83	5,85	5,86	-0,0101	-0,174
6,69	6,64	6,54	0,101	1,51
7,44	7,47	7,23	0,239	3,21

Na figura 15 está representado o gráfico das diferenças DL (%) para o soro 3.

Concluimos que os imunoensaios turbidimétricos da técnica anterior exemplificadas pelo imunoensaio de cistatina C da 'Dako' não são satisfatórios em termos de linearidade na parte inferior do intervalo de referência.

Exemplo 7 de ensaio: correlação do ensaio turbidimétrico da invenção com os métodos de referência nefelométricos

Faz-se aqui referência à publicação "New improved automated particle-enhanced turbidimetric immunoassay for quantitative determination of human Cystatin C in serum and plasma" por C. Schmidt, C. Kjoller e K Gronkjaer, acessível no website de 'Dako Cytomation', primavera de 2005. Num estudo de correlação com o método de referência nefelométrico da 'Dade-Behring', encontrou-se um ponto de intercepção de +0,214 e um declive de 0,6954 na curva de correlação. Isto constitui uma diferença grande em relação ao método de referência.

A presente invenção proporciona um método que possui uma correlação muito melhor com o método de referência, pelas razões supramencionadas.

a) Condições de ensaio

Nesta experiência comparou-se o imunoensaio de cistatina C da presente invenção, com os parâmetros regulados para o instrumento Hitachi 917, conforme descrito anteriormente, com o método de ensaio da cistatina C da 'Dade-Behring', num aparelho 'BN ProSpec' do hospital da Universidade Akademiska de Uppsala, Suécia, medindo as mesmas 51 amostras de soro em duplicado em ambos os processos (numa calibração e num dia) e comparando-os com a análise de enviesamento e com a análise de regressão linear. Além disso, determinou-se a diferença em relação ao limite superior de confiança do processo 'Dade-Behring', também designado por ponto de decisão médica. O modelo de prática experimental e a análise de dados estavam em conformidade com as recomendações do protocolo EP-2, Vol. 22, No. 19 da NCCLS.

b) Resultados

As figuras 16, 17 e 18 seguintes demonstram os resultados. As figuras 16, 17 e 18 demonstram que o processo da presente invenção proporciona surpreendentemente medições de cistatina C com um rigor muito bom, fazendo com que os resultados não sejam significativamente diferentes dos obtidos com o processo de referência nefelométrico. No presente estudo das 50 amostras analisadas, não houve nenhum enviesamento significativo entre os dois processos. No total houve um enviesamento de 0,023, num intervalo de confiança a 95% compreendido entre -0,023 e +0,0658; em termos essenciais,

não houve nenhum enviesamento significativamente diferente de zero.

O imunoensaio de cistatina C pelo processo 'Dade-Behring' revelou um ponto de decisão médica igual a 0,95 mg/L. Recorrendo à análise de regressão linear, concluímos que numa amostra em que se tenha medido o valor de 0,95 mg/L com o processo 'Dade-Behring' irá proporcionar um resultado de medição entre 0,83 e 0,89 mg/L pelo processo de imunoensaio de cistatina C de acordo com a presente invenção. A análise de comparação pelo processo do plasma teve como resultado um declive da curva de correlação igual a 0,968, com um ponto de intercepção igual a 0,103 mg/L. Isto significa que o declive e o ponto de intercepção pela análise do plasma estão dentro do intervalo de confiança em que se situam os valores de inclinação e de intercepção pela análise do soro.

Isto demonstra que o processo da presente invenção tem uma correlação muito melhor com o processo de referência nefelométrico, comparativamente com os melhores processos turbidimétricos do estado anterior da técnica.

A publicação supramencionada "New improved automated particle-enhanced turbidimetric immunoassay for quantitative determination of human Cystatin C in serum and plasma" demonstra que as medições turbidimétricas de cistatina C podem ser utilizadas para se estimar a taxa de filtração glomerular. Isto também foi demonstrado pela publicação "Simple Cystatin C-Based Prediction Equations for Glomerular Filtration Rate Compared with the Modification of Diet in Renal Disease Prediction Equation for Adults and the Schwartz and the Counahan-Barratt Prediction Equations for Children" da autoria de Grubb et

al, em *Clinical Chemistry* 51:8, 1420-1431. Há uma publicação semelhante, em que se utiliza o processo de referência nefelométrico, com o título "Calculation of glomerular filtration rate expressed in ml/min from plasma Cystatin C values in mg/l" da autoria de A. Larsson *et al.*, em *Scand. J. Lab. Invest.* 2004; 64, 25-30. Como é evidente, um processo de acordo com a presente invenção, que tenha uma correlação melhor com o processo nefelométrico, é ainda melhor para este efeito do que os processos de medição turbidimétricos da técnica anterior.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pelo requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- US 4210723 A [0085]

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- Grubb AO *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79 [0002]
- Abrahamson M *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1986, vol. 261, 11282 [0002]
- Abrahamson M *et al.*, *Biochem. J.*, 1990, vol. 268, 287-94 [0002]
- Jacobsson B *et al.* *Histopathology*, 1995, vol. 26, 559-64 [0003]
- Heyms SB *et al.* *Am. J. Clin. Nutr.*, 1983, vol. 37, 478 [0003]
- Shemesh O *et al.* *Kidn. Int.*, 1985, vol. 28, 830-8 [0004]
- Perrone RD *et al.* *Clin. Chem.*, 1992, vol. 38, 1933-53 [0004]
- Grubb. *Clinical Chemistry*, vol. 51 (8), 1420-1431 [0005]
- Coll, E., *Am. J. Kidney Disease*, 2000, vol. 36, 2934 [0006]

- **H. Stone.** Analytical performance of a particle-enhanced nephelometric immunoassay for serum Cystatin C using rate analysis. *Clinical Chemistry*, 2001, vol. 8, 1482-85 [0007]
- **C. Schmidt.** Cystatin C - The marker of choice for renal function testing. *European Clinical Laboratory*, 10 February 2004 [0008]
- **C. Schmidt; C. Kjoller; K Gronkjaer.** New improved automated particle enhanced turbidimetric immunoassay for quantitative determination of human Cystatin C In serum and plasma. *Dako Cytomation AS*, July 2005 [0008]
- **Dahr.** Turbidity in immunoturbidimetric assays. *Ann. Clin. Biochem.*, 1990, vol. 27, 509 [0009]
- *29th Nordic Congress of Clinical Chemistry*, 24 April 2004 [0009]
- **Newman et al.** *Kidney Int.*, 1995, vol. 47, 312-318 [0018]
- **Kyhse-Andersen.** *Clin. Chem.*, 1994, vol. 40(10), 1921-1926 [0019]
- **Finney et al.** *Clin. Chem.*, 1997, vol. 43 (69), 1016-1022 [0020]
- **Lewis et al.** *Ann. Clin. Biochem.*, 2001, vol. 38 (2), 111-114 [0021]
- **Mussap et al.** *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1998, vol. 36 (11), 859-865 [0022]
- **Chase, M. W. et al.** *Methods of Immunology and Immunochemistry.* Academic Press, 1967, 197-209 [0066]
- **Larsson A; Baaloew R-M; Lindahl T; Forsberg P-O.** *Poultry Science*, 1993, vol. 72, 1807-1812 [0067]
[0148]
- *Affinity Purification of Proteins*, April 2006, www.piercenet.com [0069]

- **Eda.** Development of a New Microparticle-Enhanced Turbidimetric Assay for C-reactive protein With Superior features in Analytical sensitivity and Dynamic range. *J. Clin. Lab. Analysis*, 1998, vol. 12, 137-144 [0076]
- **Pepys MB.** *Adv. Immunol.*, 1983, vol. 34, 141-212 [0076]
- **G. Köhler.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0077]
- **G. Galfre et al.** *Meth. Enzymol.*, 1981, vol. 73, 3-46 [0077]
- **R. Kennet et al.** *Hybridomas: a new dimension in biological analysis.* Plenum press, 1980 [0077]
- **G. L. Boulianne et al.** *Nature*, 1984, vol. 312, 643-645 [0078]
- **G. Winter et al.** *Nature*, 1991, vol. 349, 293 [0079]
- **J. S. Huston et al.** *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5879 [0079]
- **A. Nisssonoff et al.** *Arch Biochem Biophys*, 1960, vol. 89, 230 [0080]
- **R. P. Porter.** *Biochem J*, 1959, vol. 73, 119 [0080]
- **E. Harlow et al.** *Antibodies-A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Press, 1988, 626-631 [0080]
- **S. Yamamoto et al.** *Veterinary Immunology and Immunopathology.* Elsevier Science Publishers B.V., 1993, vol. 36, 257-264 [0082]
- **Harlow et al.** *Antibodies: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press, 1988 [0151]
- **Sensabaugh et al.** *J. Urology*, 1990, vol. 144, 1523 [0151]
- **G. Galfre et al.** *Methods in Enzymology*, 1981, vol. 73, 3-46 [0152]
- **J. L. Daiss et al.** *Methods: A Companion to Methods in Enzymology.* Academic Press Inc, 1994, vol. 6, 143-156 [0155]

- **L. G. Fagerstam et al.** *Journal of Chromatography*, 1992, vol. 597, 397-410 [0156]
- **Camilla Schmidt.** Cystatin C - The marker of choice for renal function testing. *the journal European Clinical Laboratory*, 10 February 2004 [0244]
- **Grubb.** Simple Cystatin C-Based Prediction Equations for Glomerular Filtration Rate Compared with the Modification of Diet in Renal Disease Prediction Equation for Adults and the Schwartz and the Counahan-Barrat Prediction Equations for Children. *Clinical Chemistry*, vol. 51 (8), 1420-1431 [0262]
- **A. Larsson.** Calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma Cystatin C values in mg/L. *Scand. J. Lab. Invest*, 2004, vol. 64, 25-30 [0262]

Lisboa, 23/08/2010

REIVINDICAÇÕES

1. Imunoensaio turbidimétrico para determinar a cistatina C humana numa amostra de um líquido corporal humano que compreende os passos seguintes:

a) preparar uma mistura de ensaio colocando a referida amostra em contacto com um conjugado de nanopartículas-anticorpos, o qual é constituído por nanopartículas adequadas para medições turbidimétricas, em que as referidas nanopartículas são recobertas com uma camada de um material protéico que compreende anticorpos anti-cistatina C humana ou os seus fragmentos de ligação ao antigénio, que se ligam à referida cistatina C, em que as referidas nanopartículas recobertas têm um diâmetro mediano no intervalo compreendido entre 58 nm e 200 nm e

b) determinar o teor em cistatina C humana, medindo a variação da turvação da referida mistura;

em que o revestimento é tal que as referidas nanopartículas são recobertas com 10% a 35% de anticorpos que se ligam à cistatina C humana, relativamente ao peso total do conjugado de nanopartículas-anticorpos.

2. Imunoensaio turbidimétrico para determinar a cistatina C humana numa amostra de um líquido corporal humano que compreende os passos seguintes:

a) preparar uma mistura de ensaio colocando a referida amostra em contacto com um conjugado de nanopartículas-anticorpos, o qual é constituído por nanopartículas adequadas para medições turbidimétricas, em que as referidas nanopartículas são recobertas com uma camada de um material protéico que compreende anticorpos de aves

anti-cistatina C humana ou os seus fragmentos de ligação ao antigénio, que se ligam à referida cistatina C, em que as referidas nanopartículas recobertas têm um diâmetro mediano no intervalo compreendido entre 58 nm e 200 nm e

b) determinar o teor em cistatina C humana, medindo a variação da turvação da referida mistura.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que os referidos anticorpos são anticorpos policlonais não humanos e de não roedores contra a cistatina C humana.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, em que os referidos anticorpos policlonais são anticorpos de aves contra a cistatina C humana.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 e 4, em que pelo menos 25% em peso dos referidos anticorpos policlonais ou seus fragmentos foram obtidos por purificação de afinidade com cistatina C humana.

6. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, em que os anticorpos compreendem (a) anticorpos monoclonais que se ligam a um único epítipo de cistatina C humana ou (b) um conjunto de duas ou mais espécies de anticorpos monoclonais, em que cada espécie de anticorpos monoclonais se liga a um epítipo diferente de cistatina C humana ou em que duas ou mais espécies se ligam a epítopos idênticos com uma força de ligação diferente.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, em que os anticorpos monoclonais são de origem não humana.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que as nanopartículas são recobertas com uma mistura de anticorpos anti-cistatina C humana e pelo menos uma proteína inerte.

9. Processo de acordo com a reivindicação 8, em que a proteína inerte é hidrofílica, em particular seleccionada entre hemocianina de *Megathura crenulata*, haptoglobina, albuminas e transferrinas.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a variação da turvação é medida através da variação que ocorre na absorvência da referida mistura de ensaio a uma luz com um comprimento de onda compreendido entre 500 e 600 nm e num intervalo de temperatura entre 10°C e 50°C.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida variação na turvação, expressa em Unidades mAbs/cm, para uma luz com um comprimento de onda de 546 nm, é superior a 15 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou superior a 30 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou superior a 75 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio, se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos depois de se ter formado a mistura, ou

em que a referida variação na turvação, expressa em Unidades mAbs/cm, para uma luz com um comprimento de onda de 505 nm, é

superior a 20 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou superior a 50 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou superior a 90 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio, se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos após a formação da mistura;

em que a referida variação na turvação, expressa em Unidades mAbs/cm, para uma luz com um comprimento de onda de 570 nm, é

superior a 10 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou superior a 30 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou superior a 80 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio, se a referida mistura for mantida a 37°C durante 260 segundos após a formação da mistura;

em que a referida variação na turvação, expressa em Unidades mAbs/cm, para uma luz com um comprimento de onda de 546 nm, é

superior a 12 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou superior a 25 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou superior a 70 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio,

se a referida mistura for mantida a 32°C durante 600 segundos após a formação da mistura;

em que a referida variação na turvação, expressa em Unidades mAbs/cm, para uma luz com um comprimento de onda de 546 nm, é

superior a 8 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

superior a 20 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na de ensaio ou

superior a 50 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio,

se a referida mistura for mantida a 37°C durante 120 segundos após a formação da mistura;

em que a referida variação na turvação, expressa em Unidades mAbs/cm, para uma luz com um comprimento de onda de 648 nm, é

superior a 4 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 9,9 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

superior a 7 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 19,8 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio,

superior a 15 Unidades mAbs/cm para uma concentração de 34,1 µg de cistatina C por litro na mistura de ensaio ou

se a referida mistura for mantida a 37°C durante 40 segundos após a formação da mistura.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado pelo facto de** se obter, quando se efectua uma curva de correlação com os métodos nefelométricos, um valor de intercepção para a cistatina C inferior a 0,15 mg/mL pelo método turbidimétrico comparativamente com um valor correspondente para a

cistatina C igual a 0 mg/L obtido pelo método nefelométrico; e/ou

caracterizado pelo facto de se obter, quando se efectua uma curva de correlação com os métodos de imunoensaio não homogéneo, um valor de intercepção para a cistatina C inferior a 0,25 mg/L comparativamente com um valor correspondente para a cistatina C igual a 0 mg/L; e/ou

caracterizado pelo facto de possuir um valor de interferência para os triglicéridos, com uma concentração de 15 mmol/L na amostra de ensaio, inferior a 6% relativamente ao valor medido para a cistatina C ao nível de 1,2 mg de cistatina C/L; e/ou

caracterizado pelo facto de apresentar um desvio à linearidade inferior a 5% no intervalo de medição de cistatina C entre 1,32 e 7,5 mg por litro, e um desvio à linearidade inferior a 15% na região de medição correspondente ao intervalo de medição entre 0,75 e 1,32 mg de cistatina C por litro.

13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizado pelo facto de** se determinar a concentração de cistatina C existente numa amostra medindo a taxa inicial de aumento da absorvência, (a) pelo registo directo no momento da mistura, ou (b) fazendo o registo imediatamente após a mistura, juntamente com uma extrapolação regressiva até ao aumento inicial de absorvência, ou (c) medindo a diferença de absorvências entre dois ou mais pontos no tempo inferiores a 1 minuto após se ter feito misturado a amostra com os reagentes.

14. Processo para avaliar a taxa de filtração glomerular num mamífero, em que o referido processo consiste em determinar turbidimetricamente a cistatina C humana de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

15. Estojo de reagentes ou conjunto de reagentes para a realização do processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, o qual compreende (a) partículas, constituídas por imunopartículas anti-cistatina C conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 anteriores, numa forma anidra ou em suspensão, (b) um tampão de ensaio numa forma anidra ou dissolvida, e, facultativamente, (c) misturas de calibração e misturas de controlo, qualquer delas numa forma anidra ou dissolvida.

16. Estojo de acordo com a reivindicação 15, em que as partículas e o tampão de ensaio são fornecidos em conjunto, quer numa forma anidra quer em suspensão.

17. Conjugados de nanopartículas-anticorpos de acordo com a definição em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

18. Utilização dos conjugados de nanopartículas-anticorpos da reivindicação 17 para um imunoensaio para a avaliação da cistatina C humana, ou num processo de diagnóstico para a medição da taxa de filtração glomerular de um mamífero; ou num imunoensaio para avaliação de cistatina C humana ou num método de diagnóstico para a avaliação da disfunção renal.

Lisboa, 23/08/2010

FIG. 1

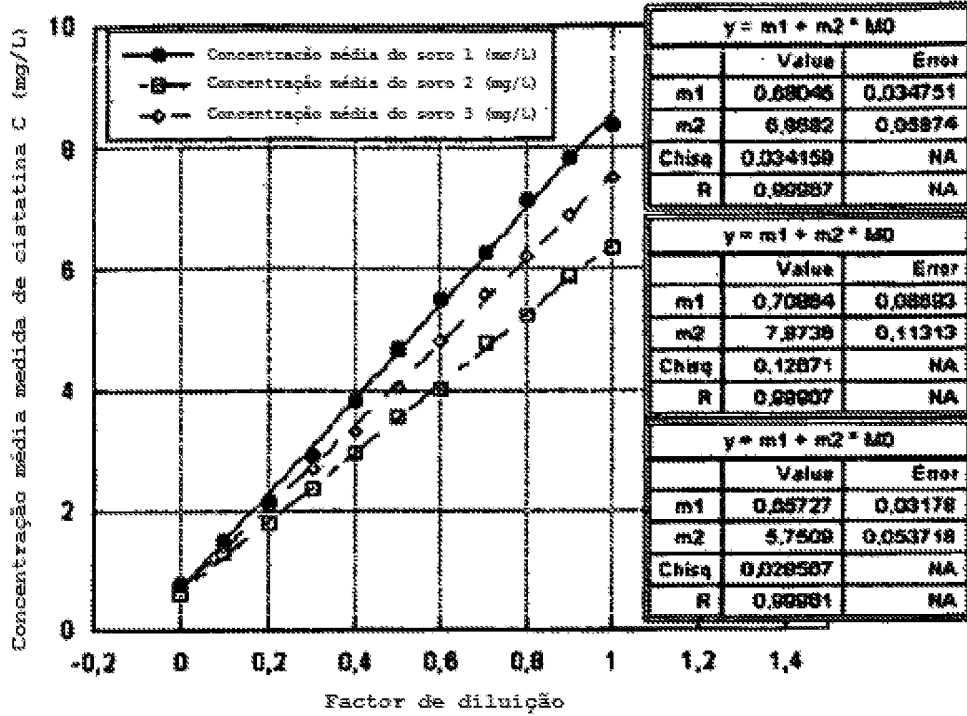


FIG. 2

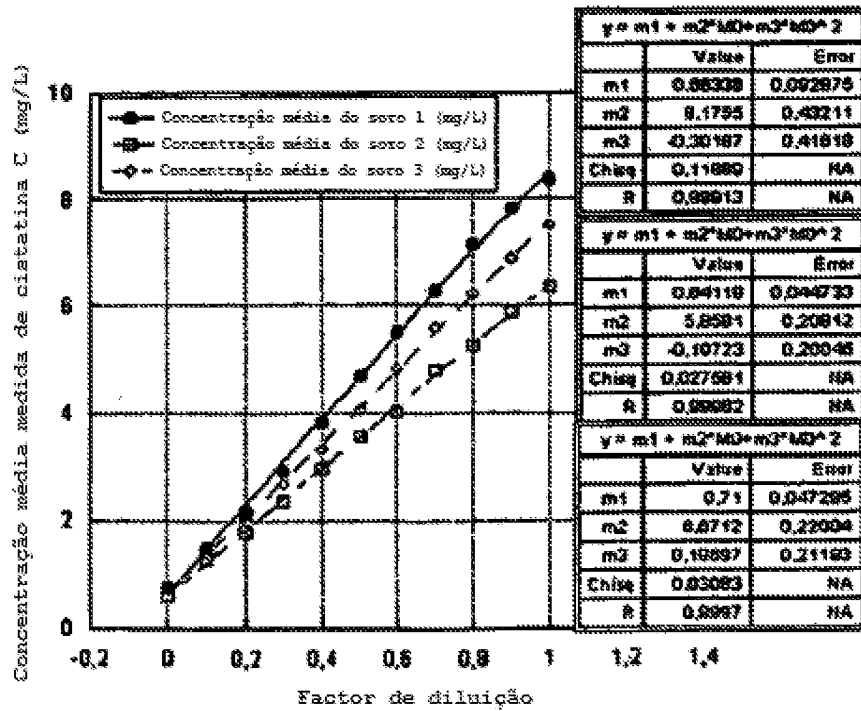


FIG. 3

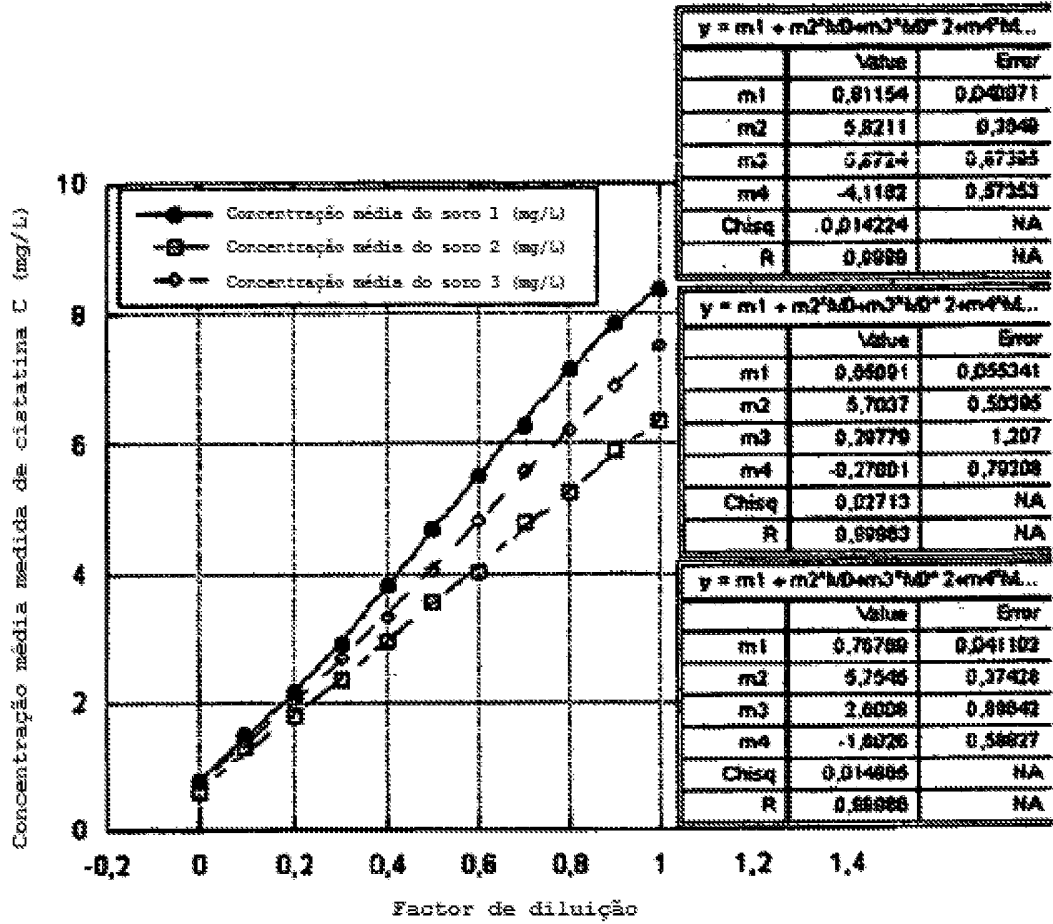


FIG. 4

Gráfico de DL (%), soro 1
DL (%) vs concentração média medida

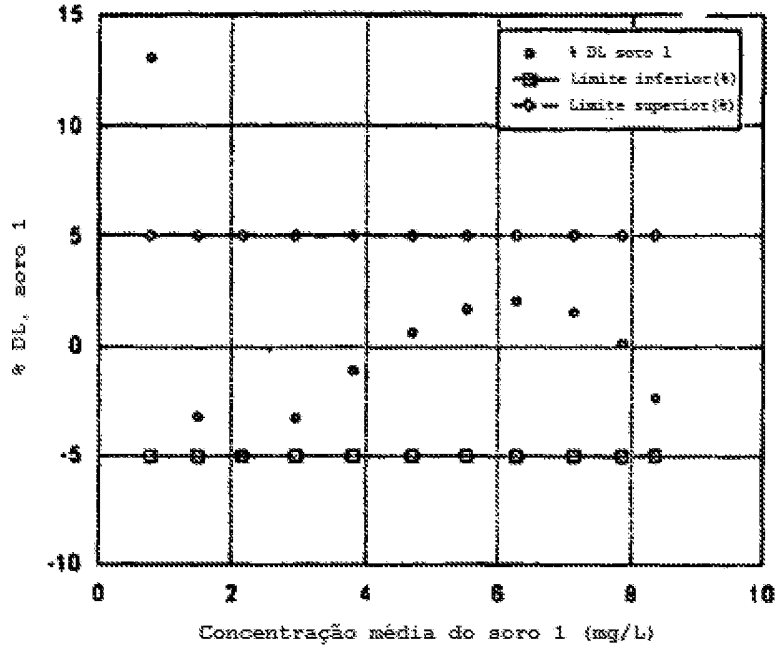


FIG. 5

Gráfico de DL (%), soro 3
DL (%) vs concentração média medida

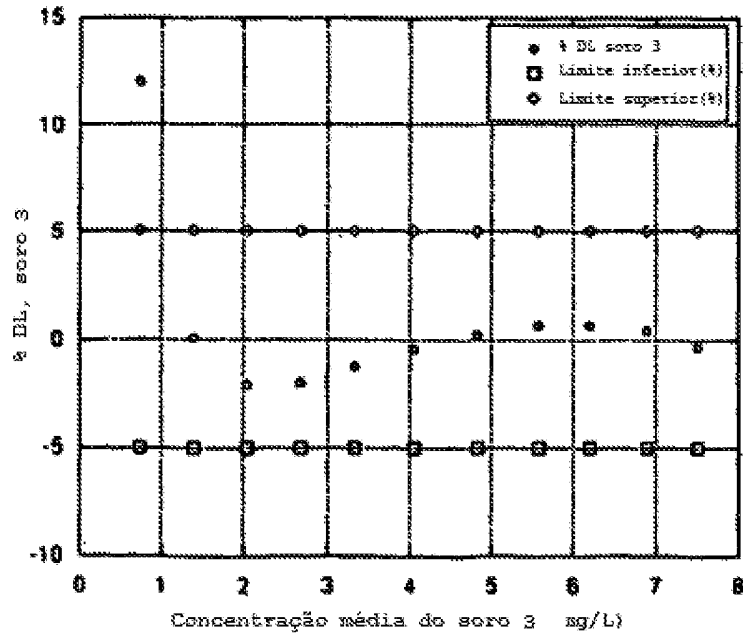


FIG. 6

Linearidade do imunoensaio de cistatina C 'Gentian' com o aparelho Architect ci8200.

Concentração média medida de cistatina C vs factor de diluição.

Análise por regressão linear.

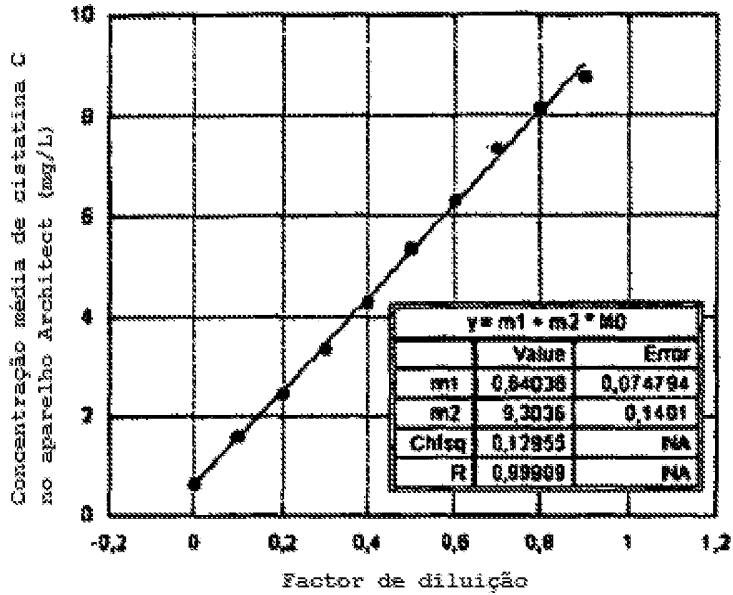


FIG. 7

Linearidade do imunoensaio de cistatina C 'Gentian' com o aparelho Architect ci8200.

Concentração média medida de cistatina C vs factor de diluição.

Análise por regressão de segunda ordem.

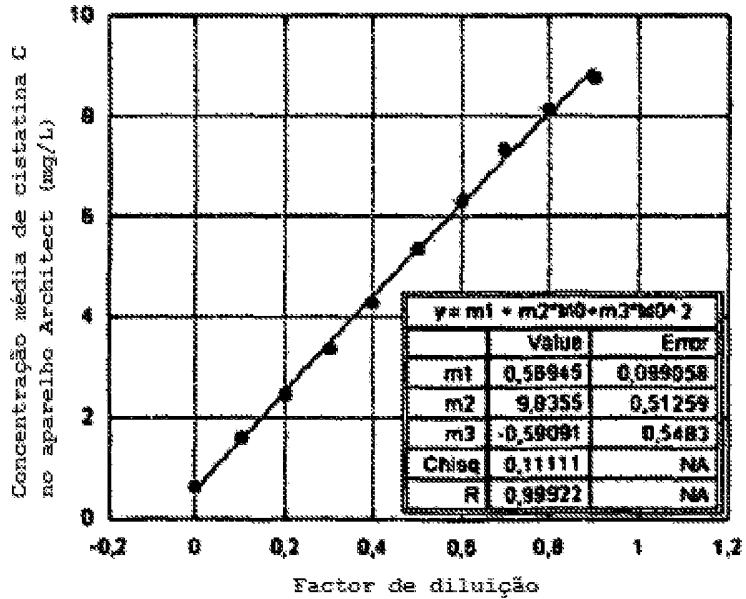


FIG. 8

Linearidade do imunoensaio de cistatina C 'Gentian' com o aparelho Architect ci8200.

Concentração média medida de cistatina C vs factor de diluição.
Análise por regressão de terceira ordem.

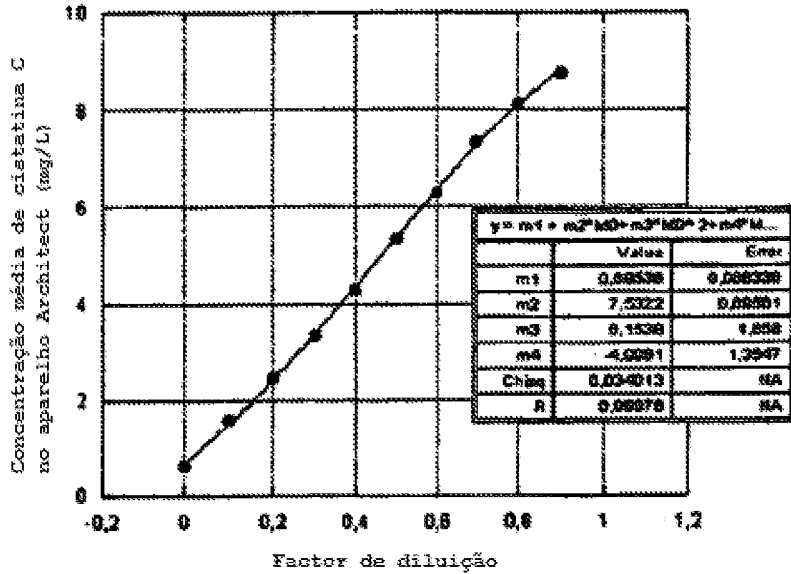


FIG. 9

Representação de diferenças.

% de diferença da diferença absoluta entre os pontos de regressão de primeira e de terceira ordens e a concentração média medida.

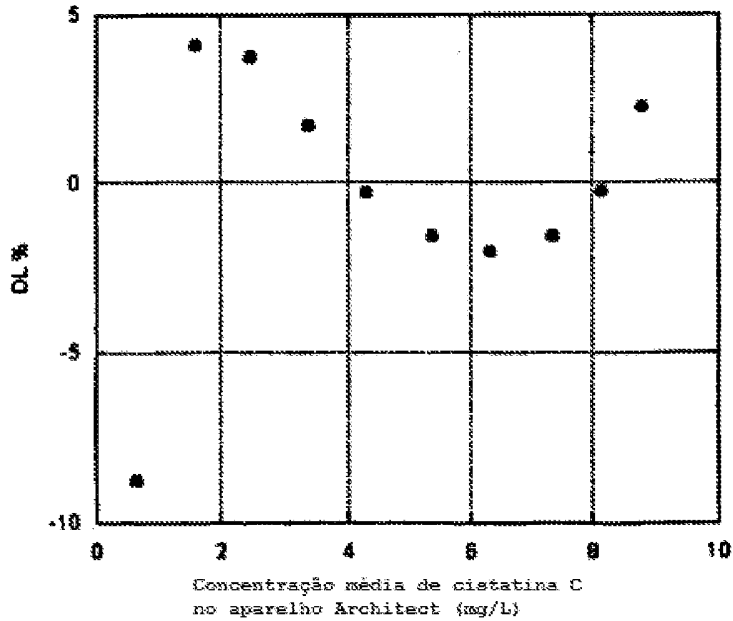


FIG. 10

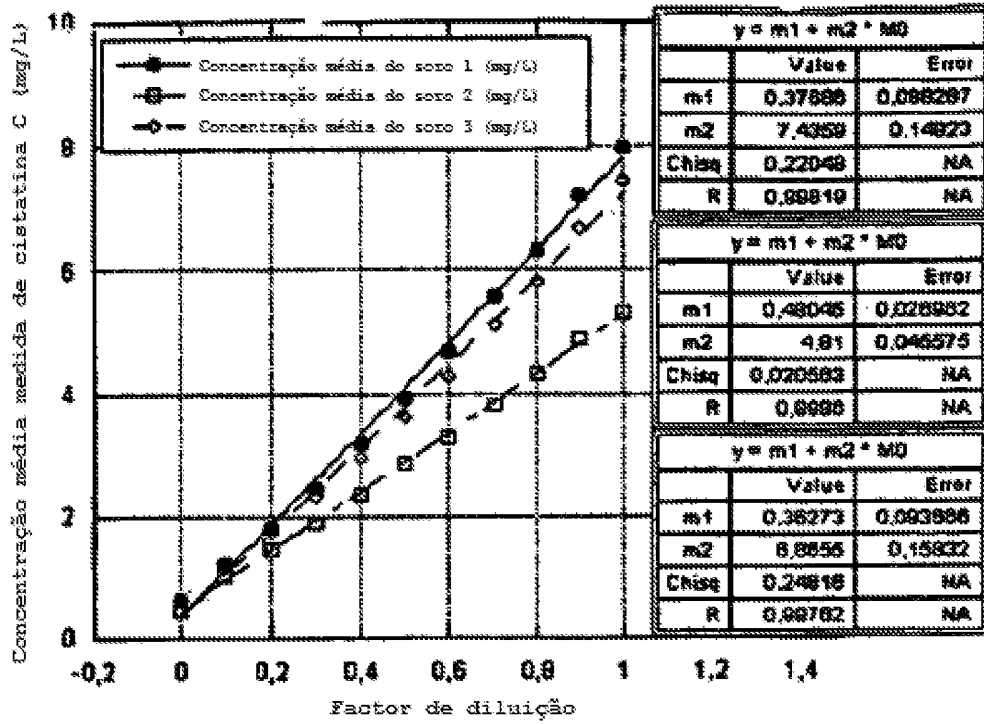


FIG. 11

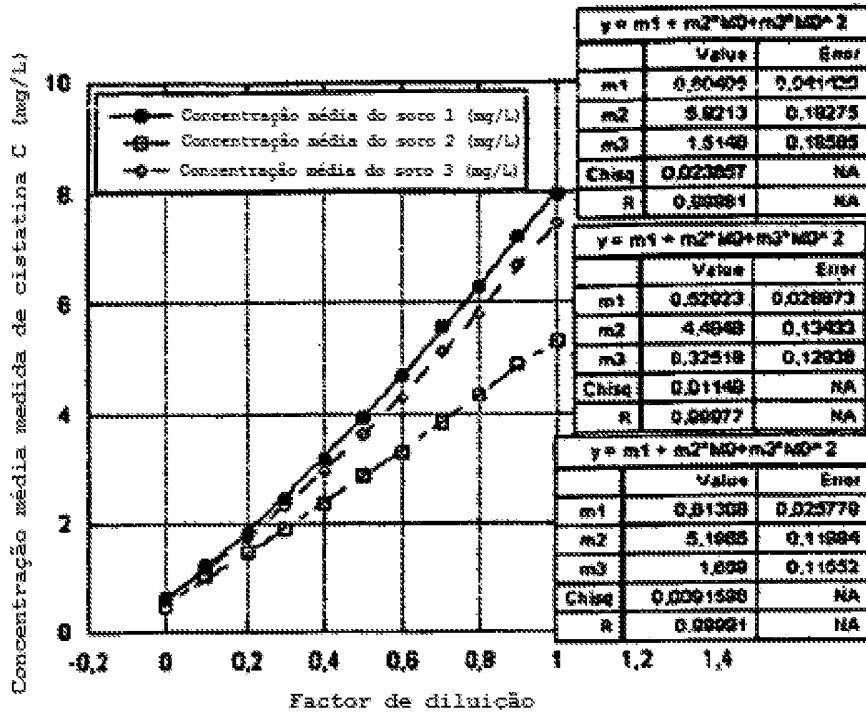


FIG. 12

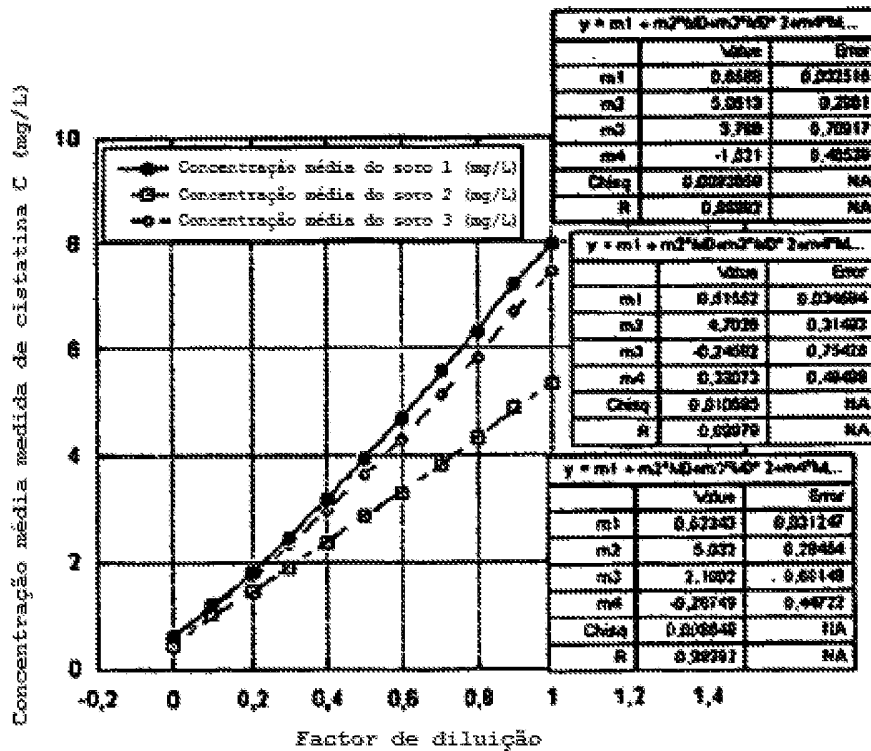


FIG. 13

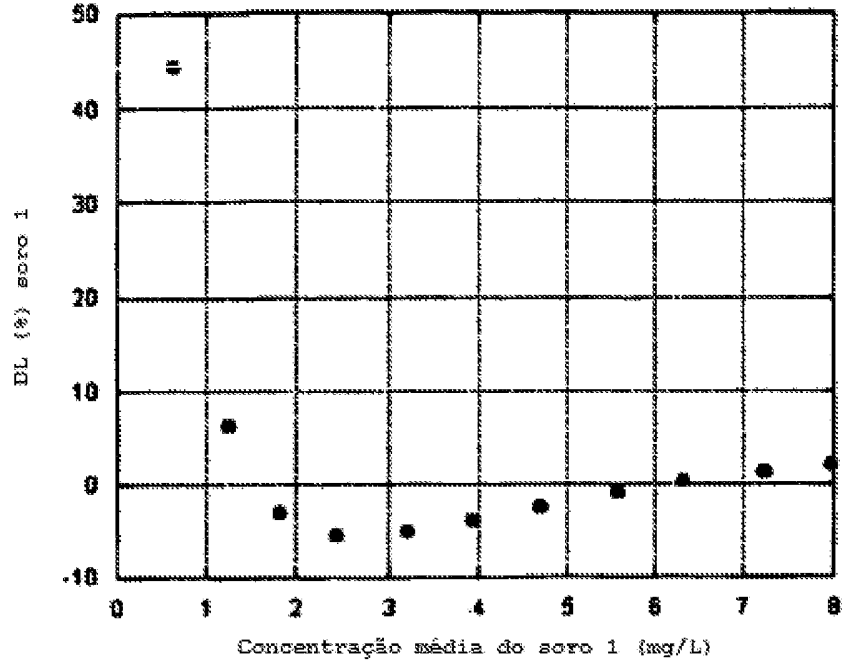


FIG. 14

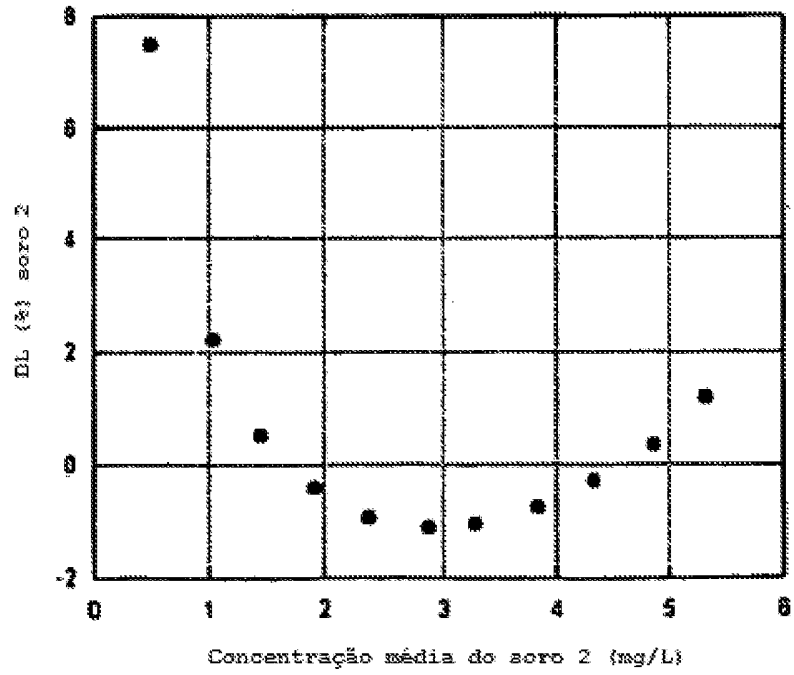


FIG. 15

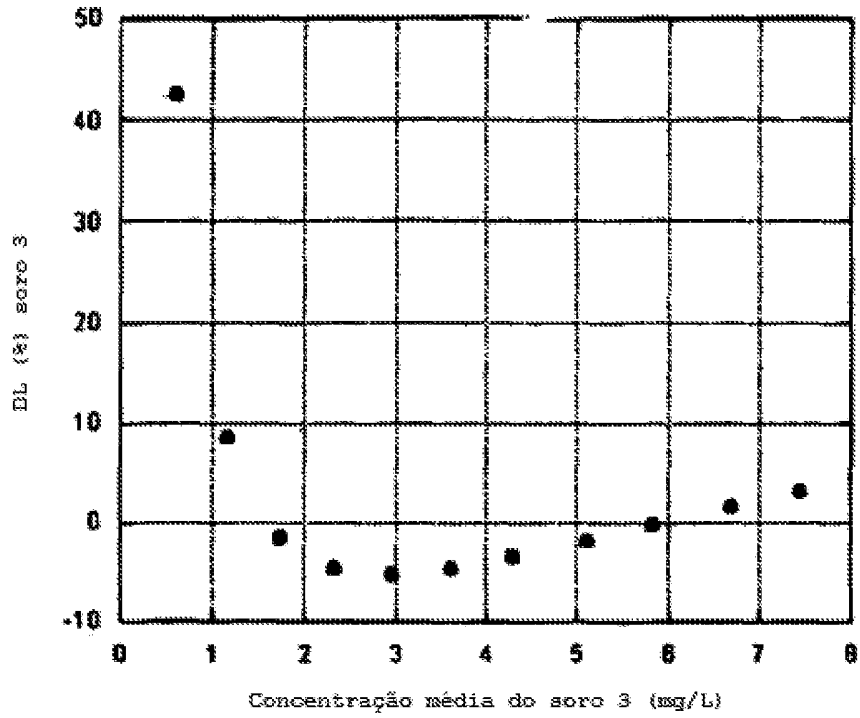


FIG. 16

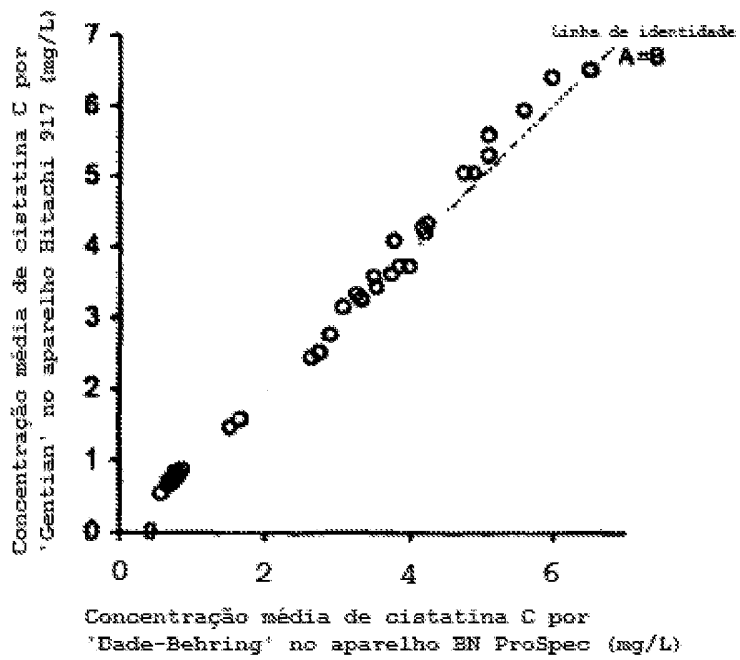


FIG. 17

n	50		
Enviessamento	0,917		
95% CI	-0,023 a 0,058		
Limita 95% de concordância		95% CI	
Inferior	-0,261	-0,329	to -0,194
Superior	0,296	0,229	to 0,363

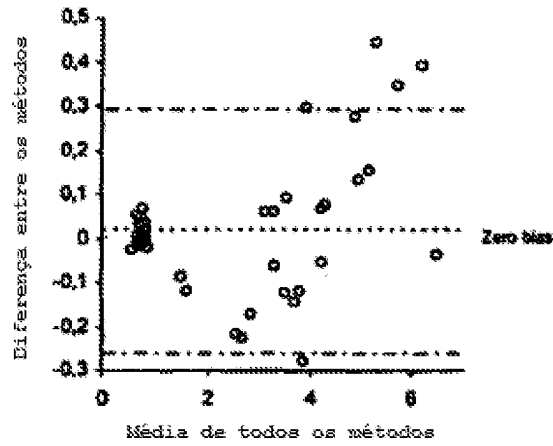


FIG. 18

