

**PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO
CELULAR - CELISA- PARA DETECÇÃO DE ALOANTICORPOS
LEUCOCITÁRIOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Sandra Trevisan Beck
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

23/01/98

Tese de Mestrado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação em Biologia
Área de Concentração em Fisiologia
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

**PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO
CELULAR - CELISA- PARA DETECÇÃO DE ALOANTICORPOS
LEUCOCITÁRIOS**

ORIENTADORA: PROFª DRª SOFIA ROCHA LIEBER

**Trabalho realizado no
Laboratório de Histocompatibilidade
Hemocentro - UNICAMP**

UNIDADE	30
N.º CHAMADA:	7/UNICAMP
	B388p
V.	Ex.
TOMBO BC/	32950
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/03/98
N.º CPD	

CM-00106581-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Beck, Sandra Trevisan

B388p Padronização do método imunoenzimático celular - CELISA -
para detecção de aloanticorpos leucocitários / Sandra Trevisan Beck.
-- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
88f.: ilus.

Orientadora: Sofia Rocha Lieber

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Ensaio imunoenzimático. 2. Antigenos de histocompatibilidade
HLA. 3. Anticorpos. I. Lieber, Sofia Rocha. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestre

Padronização do Método Imunoenzimático Celular - CELISA - para Detecção de Aloanticorpos Leucocitários

Aluna: Sandra Trevisan Beck

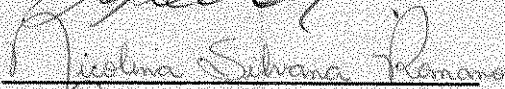
Orientadora: Profa. Dra. Sofia Rocha Lieber

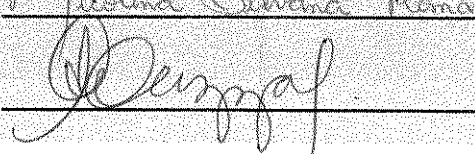
Membros Titulares:

1. **Profa. Dra Sofia Rocha Lieber**
2. **Profa. Dra. Nicolina Silvana Romano**
3. **Prof. Dra. Marilda Mazalli**

Assinaturas







Membros Suplentes:

1. **Profa. Dra Ligia Beatriz Persoli**

Curso de Pós-Graduação em Biologia , area de concentração, Fisiologia, da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/01/1998

Aos Meus Pais,

Ivo e Therezinha

Pelo amor, compreensão, e estrutura familiar que me proporcionaram, permitindo que eu tivesse liberdade para trilhar o meu próprio caminho.

Não é possível existir
Naquilo que não fui
naquilo que não vivi
Mas é possível existir
Naquilo que tentei
Naquilo que busquei
Naquilo que senti

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

À **Profª. Drª. Sofia Rocha Lieber**, que além de orientadora se revelou grande amiga.

À **Drª. Ligia Beatriz Lopes Persoli**, e **Silvia Babosa Dutra Marques**, pelo apoio dado para que esta tese tivesse condições de ser desenvolvida no laboratório de Histocompatibilidade.

A todos os funcionários do Laboratório de Histocompatibilidade do Hemocentro, pelo companheirismo, apoio, afeto familiar, tão importante para quem se encontra longe dos seus. Vocês se tornaram uma segunda família, e me foram muito importantes nesta etapa de vida.

À Disciplina de Nefrologia do Departamento de Clínica Médica - FCM, UNICAMP, em especial à **Profª Drª Marilda Mazzali**, pela oportunidade de um profícuo intercâmbio.

Aos funcionários do Setor de Sorologia do Hemocentro, e sua Supervisora **Drª Neiva Sellan Lopes Gonçalves**, que me auxiliaram com extrema boa vontade sempre que necessário.

Aos Docentes de Funcionários do Departamento de Fisiologia, pela oportunidade de convívio e troca de conhecimentos durante o desenvolver do curso.

À Profª. **Josefa Alvarez-Alvarez**, pelas valiosas sugestões na análise estatística dos dados.

A todas as colegas de "república", **Eliana, Luciana, Verônica, Cristiane**, que estiveram presente comigo nesta jornada e em especial a minha amiga **Simone** pelo apoio, amizade e companheirismo demonstrado em todos os momento.

À Profª. **Aralys Borges de Freitas**, pela revisão ortográfica.

ÍNDICE

	Página
Abstract.....	1
Introdução.....	2
Objetivos.....	11
Materiais e Métodos.....	12
Resultados.....	23
Discussão.....	51
Resumo e Conclusões.....	63
Referências Bibliográfica.....	64
Anexos.....	72

ABSTRACT

Conventionally, HLA allosensitization is defined by the reactivity level of the patient's serum against a panel of lymphocytes of at least 30 distinct HLA individuals (RCP), by the classic complement lymphocytotoxicity assay (CDC). This method is difficult to process in a short period of time due to the need of obtaining viable lymphocytes.

The aim of the presente work was to standardize the CELISA method, with possible automation, using dehydrated suspensions of T lymphocytes, stored on microplates at -20° and to evaluate their sensitivity and specificity for CDC and potencialized with human antiglobulin (CDC-AHG).

Based on HLA positive and HLA negative control sera, the following topics were evaluated: types of microtiter plates available on market, blocking buffers for undetermined sites, conjugate concentration and serum treatment methods.

When a blocking solution composed of TRIS-HCL(pH 7,6), 0,1% Triton-x-100, 1% rabbit serum and 3% non fat milk powder, was used the tree types of plates which were evaluated presented similar results.

We recommend the use of 5×10^4 lymphocytes per well (50 μ l of 1×10^6 /PBS), as higher concentration resulted in an increase in non specific reactions and lower concentration a decrease the sensibility of the test.

Before the tests are carried out, the serum samples should be frozen, and afterwards treated with thrombin and centrifuged, due to the fact that serum of some patients with coagulation disorders may present fibrin clots even after clot retraction, and this could lead to false positive results.

The comparison of 226 crosmatches tests revealed that there was a concordance of 75,2% between CELISA and CDC methods and a of 81,4% between CELISA and CDC-AHG methods, using the serum of peganant women in the first trimester and of poli-transfused chronic renal patients. It was not possible to evaluate the relevance of the alloantibodies detected by CELISA and CDC-AGH methods in graft outcome due to the smal number of transplanted patients included in this study.

Finally we conclude that the CELISA method was useful in the detection of lymphocyte alloantibodies, presenting an equivalent sensitivity to the potencilized CDC method (AHG protocol).

However IgM class antibody or low affinity antibodies would not be detected by the CELISA method, this fact though, does not invalidate the purpose of this work, which was the determination of the RCP level in pre-transplantation samples. The method can be used, routinely, to follow-up the evolution of RCP in the serum samples of chronic renal patients, collected at different times. When the identification of HLA especificities is not possible, we reommand to perform RCP using the CDC-AHG method, which in spite of being laborious and dependent on viable cells, is, as CELISA, clearly more sensitive than the classic CDC method.

INTRODUÇÃO:

O complexo principal de histocompatibilidade (CPH) é uma região de genes altamente polimórficos que expressam seus produtos na superfície de uma variedade de células. Mais de 200 genes estão localizados nesta região (Trowsdale & Campbell, 1997). Este complexo está localizado no cromossoma 17 do camundongo (complexo H2) e no braço curto do cromossoma 6 do homem. Neste é conhecido como complexo HLA ou Antígenos de Leucócitos Humanos (Dausset, 1989).

Os *loci* da região HLA denominada classe I codificam glicoproteínas de superfície celular que correspondem aos antígenos HLA de classe I (antígenos HLA, A,B,C), presentes em todas as células nucleadas. Novos genes denominados não clássicos, como HLA-E, F e G apresentam estruturas similares e estão presentes na mesma região (Nepom & Nepom, 1995). As moléculas de classe I são constituídas por uma cadeia α polimórfica organizada em três domínios globulares, α_1, α_2 , e α_3 , associada na membrana celular à cadeia β_2 microglobulina, não polimórfica e codificada por um gene localizado fora do CPH (cromossoma 15 humano). As moléculas de classe I possuem papel na apresentação de peptídeos antigênicos estranhos para as células T citotóxicas, e são importantes antígenos de transplantação responsáveis pela rejeição de aloenxertos junto com as moléculas HLA de classe II.

As moléculas classe II compreendem glicoproteínas de superfície denominadas HLA-DR, DP e DQ, codificadas por genes que também se encontram localizadas em regiões do CPH. São formados por dois polipeptídeos glicosilados transmembrana associados, chamados de cadeia α e β , organizados em domínios α_1, α_2 , e β_1, β_2 respectivamente (Schwartz, 1991). Estão presente na superfície de linfócitos B, e células apresentadoras de antígenos (APC) e parecem estar envolvidos na interação célula-célula, regulando a apresentação de antígenos e a cooperação celular T e B. Novos genes encontrados na região classe II, como LMP2, LMP7, TAP1 e TAP2 têm mostrado importância para o estudo de associação do sistema HLA com doenças (Nepom & Nepom, 1995).

Diferente do sistema das imunoglobulinas, onde a variabilidade é adquirida em cada indivíduo por um sistema multigênico, o CPH varia de indivíduo para indivíduo por um alto grau de polimorfismo e um grande número de alelos. As moléculas classe I, HLA, A e B são altamente polimórficas; já as moléculas de classe II, $DQ\alpha_1, DQ\beta$ e $DR\beta_1$ são menos, enquanto $DR\alpha$ e β_2 -microglobulina não variam em sua estrutura. Este polimorfismo decorre de substituições de aminoácidos no nível dos domínios α_1 e α_2 , da molécula classe I e no nível dos domínios α_1 e β_1 , da molécula classe II. As múltiplas formas de alelos podem ser geradas por uma variedade de mecanismos: mutação pontual, recombinação e conversão gênica.

Existem pelo menos 59 alelos distintos no *locus* HLA-A, pelo menos 118 alelos

distintos no *locus* HLA-B e 36 alelos no *locus* HLA-C (Bodmer, et al., 1997). Cada alelo determina a estrutura da cadeia glicoproteica. O extensivo polimorfismo destas moléculas parece ter papel central na sua função. As variações quantitativas e/ou qualitativas dos epítomos envolvidos neste polimorfismo podem alterar a função destas moléculas na resposta imune (Festenstein & Schmidt, 1981); maximizar a proteção contra diferentes microorganismos; além de tornar praticamente impossível o encontro de dois indivíduos, não aparentados, portando o mesmo genótipo HLA.

Devido à sua íntima relação, a combinação de alelos em cada *locus* de um único cromossomo costuma ser herdada como uma unidade. Esta unidade é referida como o haplótipo. Uma vez que os indivíduos herdam um cromossoma de cada genitor, cada indivíduo tem dois haplótipos HLA. Todos os genes HLA são codominantes e, portanto, ambos os alelos em um dado *locus* HLA, um de cada genitor, podem ser detectados na células. Com base na herança mendeliana, há 25% de chance de que dois irmãos compartilhem ambos os haplótipos, uma chance de 50% de que eles compartilhem um haplótipo e uma chance de 25% de que eles não compartilhem haplótipo algum e, por isso, sejam completamente HLA incompatíveis. (Schwartz, 1991).

Os antígenos HLA com epítomos antigênicos presentes em uma única molécula (e não em outra) são designados antígenos HLA privados. Ao contrário, antígenos HLA públicos são determinantes comuns a várias moléculas do HLA, cada uma das quais, adicionalmente, apresentando pelo menos um epítomo HLA privado distinto. Para exemplificar esta situação, podemos citar os antígenos HLA-A23 e HLA-A24, inicialmente descritos como uma única especificidade HLA-A9. Estes antígenos são conhecidos como "splits" (divisão) do antígeno HLA-A9. Outros antígenos como HLA-Bw6 ou HLA-Bw4 abrangem, cada um, mais de 75 especificidades privadas definidas sorologicamente. De acordo com o padrão de reação frente a diferentes soros anti-HLA específicos, as especificidades privadas podem ainda ser agrupadas em grupo de "CREG" (do inglês, Cross Reacting Group), ou seja, grupo de reação cruzada. Antígenos HLA pertencentes a um mesmo grupo de "CREG" apresentam vários epítomos antigênicos em comum, além dos seus epítomos privados.

No CPH, além dos genes que codificam as moléculas HLA das classes I e II, há genes que codificam componentes do sistema complemento (C2, C4a, C4b, fator B) e TNFa, TNFb, 21OHA, 21OHB e Hsp70. Estes genes estão localizados na região denominada região codificadora dos antígenos classe III (Nepom & Nepom, 1995).

O Sistema HLA, além de desempenhar papel relevante na resposta imunitária do hospedeiro original (Mc Devitt, 1980; Stastny, et al., 1983), é também o mais importante sistema antigênico na determinação da sobrevivência de transplante de órgãos ou tecidos alogênicos, por evocarem processo de rejeição quando transferidos para um hospedeiro não compatível. Reações transfusionais também podem ocorrer no momento de uma transfusão

plaquetária em receptores aloimunizados. Por esta razão, a detecção de anticorpos anti-HLA no soro é freqüentemente necessária em várias situações clínicas.

Durante as últimas décadas, diversos estudos analisaram os efeitos da compatibilidade HLA em relação à sobrevida dos transplantes renais, sendo importante seu significado na sobrevida dos transplante com órgãos de doadores vivos relacionados (Braum, 1978). Em relação aos transplantes renais com órgão de cadáver, já está bem estabelecido que a correlação HLA-B e HLA -DR é melhor que a HLA-A e HLA-B. Quando ré-transplantes são analisados não é observada esta diferença, encontrando-se aproximadamente 82% de sobrevida com compatibilidade total, diminuindo até 54% com nenhuma compatibilidade (Opelz, 1989).

No início da década de 1950, foi demonstrada a presença de aloanticorpos anti-leucocitários em soro de pacientes politransfundidos (Dausset, 1954), determinando o marco inicial para a definição dos antígenos HLA..

Nos anos 60, foi observado por diversos grupos que a presença de anticorpos anti-HLA no soro do receptor contra linfócitos totais do doador (prova cruzada) era seguido de rejeição hiperaguda do órgão transplantado (Kissmayer-Nielsen, et al., 1966; Ross & Yap, 1990).

Transfusões sangüíneas, gravidez e transplante de órgãos são situações que induzem a sensibilização do sistema imune contra antígenos leucocitários humanos, levando a formação destes anticorpos que, quando são reativos contra uma grande proporção de indivíduos da população, podem criar obstáculos à realização do transplante devido à dificuldade de encontro de doador contra o qual o receptor não possua anticorpos pré-formados. Pacientes em estágio final de doença renal, que requerem transplante, normalmente possuem aloanticorpos devido ao fato de se encontrarem freqüentemente expostos a vias que levam a sensibilização como transfusões sangüíneas e transplante de órgãos (Opelz, 1981). Sendo, a presença destes anticorpos alogênicos, relação direta com a rejeição de enxerto, há necessidade de avaliar em pacientes, em lista de espera para transplante renal, a existência e a especificidade de aloanticorpos pré-formados dirigidos aos antígenos de histocompatibilidade.

O nível de sensibilização em que estes pacientes se encontram é convencionalmente avaliado pelo grau de reatividade do soro do paciente frente a um painel de linfócitos em que esteja representada a grande maioria das especificidades HLA.

O grau desta reatividade contra painel (RCP) tem sido convencionalmente expresso como a porcentagem das células do painel contra as quais o soro do paciente apresenta reações citotóxicas por anticorpos fixadores de complemento. Esta RCP é determinada através da reação de microlinfocitotoxicidade frente a suspensões de linfócitos totais de pelo menos 30 indivíduos normais, previamente selecionados de modo a abranger o maior número

possível de diferentes especificidades HLA conhecidas.

Também têm sido relatadas variações no nível de RCP no soro de pacientes renais crônicos ao longo do tempo. Tanto aumento, como diminuição superiores a 20 ou 40 pontos percentuais, tem sido observados, principalmente, entre pacientes do sexo feminino (Lieber et al., 1992^a). A RCP também pode ser empregada na seleção de doadores para plaquetofereze, em pacientes com patologia plaquetária.

Pacientes com doença renal freqüentemente possuem tendência a sangramento associado a falha renal (Riesman, 1907). Esta tendência é associada a uremia, a qual leva a desordens da hemostasia como anomalias dos fatores de coagulação do plasma, fibrinólise, e disfunções plaquetárias. (Castaldi et al., 1966; Rubiner, 1972). Além de tal tendência à sangramento, a insuficiência renal crônica causa a diminuição da síntese do hormônio eritropoetina, levando ao desenvolvimento de anemia, que pode ser corrigida com transfusões sangüíneas (Livio et al., 1982; Fernandes et al., 1985), e, mais recentemente, com o uso da eritropetina sintética (Moia et al., 1987). Alterações qualitativas e quantitativas das plaquetas são também observadas após transplante renal ou rejeição do enxerto (Capitanio et al., 1982).

As provas cruzadas (crossmatch) pré-transplante são realizadas com o objetivo de detectar anticorpos anti-HLA pré formados, no soro de pacientes, contra os antígenos HLA do potencial doador.

Parâmetros, como prova cruzada negativa e determinação do grau de reatividade contra painel, são muito importantes no momento da seleção de um receptor para transplante renal. Pacientes cujo soro apresenta alta RCP (grau de reatividade maior que 50%) têm duas desvantagens: dificuldade de encontro de doadores contra os quais não estejam sensibilizados, e menor possibilidade de sucesso do transplante (Glass et al., 1982), mesmo na vigência de prova cruzada negativa; embora trabalhos mais recentes não confirmem esta correlação (Sanfilippo et al., 1990). Esta contradição provavelmente se explique pelo uso de tratamento imunossupressor mais eficaz, utilização de doadores mais compatíveis com o receptor, e/ou utilização de técnicas mais sensíveis de prova cruzada pré-transplante. Contudo, o grau de RCP continua sendo um dos parâmetros importantes usados para a escolha do paciente em lista de espera no momento do transplante renal.

Na década de 70, a análise da sobrevida do enxerto revelou boa evolução do transplante realizado na presença de prova cruzada positiva para linfócitos B e prova cruzada negativa para linfócitos T (Mohanakumar et al., 1979; Ettenger et al., 1979). Possivelmente estes anticorpos anti linfócitos B seriam auto-anticorpos, não sendo prejudiciais ao enxerto (Cross et al. 1976, Stanstny & Austin 1976; Ting, 1989).

A classe de imunoglobulina no soro positivo parece ter também importância. Os anticorpos IgM anti-HLA sugerem sucesso, enquanto os IgG estão associados a rejeições

(Braun 1989, Iwaki et al., 1986; Chapman et al., 1986).

Apesar de todos os estudos para incremento na sobrevida do transplante renal, disfunções renais graves têm sido observadas em pacientes com prova cruzada para linfócitos T negativa, sendo 16% no primeiro transplante e 26% em pacientes retransplantados (Iwaki et al., 1987). Esta aparente contradição possivelmente se deva a limitações da técnica de microlinfocitotoxicidade, em detectar baixo título de anticorpos ou anticorpos não fixadores de complemento.

Pesquisa de Anticorpos anti-HLA

Os diversos métodos empregados para a investigação de anticorpos anti-HLA que utilizam células vivas, variam quanto a sua sensibilidade e especificidade. Entre eles, podemos citar: a microlinfocitotoxicidade clássica dependente de complemento -CDC- (Hopkins, 1990): CDC acrescida de lavagens antes da adição do complemento (Amos et al. 1969); e CDC potencializada pela adição de antigamaglobulina humana -AGH- (Johnson et al., 1972); além da citometria de fluxo (Garovoy et al., 1983).

A microlinfocitotoxicidade clássica consiste na incubação prévia de linfócitos viáveis do potencial doador com o soro do receptor e posterior incubação com soro de coelho como fonte de complemento. São consideradas reações positivas as escavações da placa de microlinfocitotoxicidade, onde mais de 50 % dos linfócitos se encontram mortos. A observação da porcentagem de células mortas é feita através da adição de corantes vitais como, por exemplo, azul tripan. Este teste pode ser afetado por fatores anticomplementares do soro e pela baixa avidéz de alo ou auto-anticorpos. Para minorar este tipo de problema, foi introduzida, na técnica clássica, a lavagem das células antes da adição do complemento e a adição de AGH. Esta lavagem diminui a incidência de auto-reatividade e aumenta a sensibilidade do teste provavelmente pela remoção de fatores anticomplementares, anticorpos não fixados e auto-anticorpos de baixa avidade do soro do paciente.

O uso de AGH junto com a lavagem das células, potencializa a ação do complemento, permitindo a detecção de anticorpos em baixo título ou que não fixam complemento adequadamente. Um inconveniente deste procedimento é o risco existente no uso do AGH, que pode vir a prejudicar a viabilidade das células, dificultando a distinção entre reação positiva e negativa.

Devemos ressaltar que a técnica de microlinfocitotoxicidade clássica não detecta anticorpos não fixadores de complemento, e que a avaliação da reatividade contra painel de linfócitos (RCP), tão importante na seleção de candidatos a transplante, é normalmente realizada usando-se a prova clássica, isto é, sem lavagem ou adição de AGH.

Outras limitações da técnica de microlinfocitotoxicidade são: (1) a necessidade do uso de células vivas, o que inviabilizaria a realização da prova de reatividade contra painel com a

amostra de soro obtida para a prova pré transplante, em casos de doadores cadáver;(2) dificuldade em diferenciar anticorpos citotóxicos não-HLA de anticorpos anti-HLA específicos, e (3) a impossibilidade do seu uso em pacientes transplantados em tratamento com anticorpos citotóxicos anti células T ou tímócitos (ATG), ou anticorpos monoclonais anti-linfócitos (OKT3) (Zachary et al., 1995).

No início dos anos de 1980, as primeiras descrições e aplicações da citometria de fluxo para prova cruzada pré-transplante e monitorização de transplante foram publicadas (Garovoy et al., 1983) e se expandiram consideravelmente no início de 1990.

O princípio da citometria de fluxo está bem estabelecido. As células são suspensas em um meio líquido e injetadas em uma corrente fluída. Um raio de luz (laser, lâmpada de mercúrio) é emitido sobre a corrente líquida e cada célula na suspensão deve individualmente passar através deste raio. Assim que cada célula interage com a luz, esta é dispersa para um medidor que inicialmente vai relatar o tamanho da célula. Simultaneamente, as células coradas com um ou mais marcadores fluorescentes específicos para o parâmetro a ser medido, ligados à célula, são excitados e emitem luz fluorescente. Tanto a luz dispersa quanto a fluorescente emitida são convertidas em sinais eletrônicos que caracterizam cada célula. Porque as células podem ser medidas individualmente, as populações de células podem ser estudadas, possibilitando detectar subpopulações e possíveis mudanças. O teste é realizado com soro do paciente e células do doador do órgão transplantado. As células podem ser usadas frescas ou criopreservadas, embora não existam estudos publicados que estabeleçam que células congeladas e linfócitos recém separados dão resultados comparáveis. Sua maior sensibilidade é devida à independência de lise por complemento e por permitir a distinção da classe do aloanticorpo envolvido.

Embora a citometria de fluxo permita a detecção de baixas concentrações de anticorpos, necessita de um grande número de células para ser executada, tem alto custo, e é de difícil padronização (Nehlsen- Cannarella et al., 1994).

Até o momento, alterações no método original têm se relacionado com a padronização e especificidade dos resultados, onde reações positivas com linfócitos B e negativas com linfócitos T têm sido uma das maiores dificuldades de interpretação da relevância clínica da prova cruzada (Ogura et al. ; 1993).

Métodos Imunoenzimáticos:

A introdução de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), para a detecção de aloanticorpos, se deu pela necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de microlinfocitotoxicidade existentes, as quais são demoradas, e nem sempre sensíveis o suficiente, dependendo do objetivo para o qual são empregadas.

O Enzima-imunoensaio (EIA) foi descrito, em 1971, por Van Weemen e Schuurs, para

a pesquisa de hormônios; e paralelamente por Engvall e Perlmann, com o nome de ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"), para a pesquisa de imunoglobulinas. Desde então, uma variedade de outros nomes foram propostos, (CELIA, ELA, CELISA etc.). O teste consiste em um método onde a reação antígeno-anticorpo é monitorada por medida da atividade enzimática. Foi classificado por Rubenstein, em 1978, em dois tipos: homogêneo e heterogêneo. Nos ensaios homogêneos não é necessária a separação entre os complexos antígeno-anticorpo e o antígeno e/ou anticorpo livres, pois a interação antígeno-anticorpo modula a atividade da enzima. Nos ensaios heterogêneos, a separação é necessária, pois a atividade da enzima não é alterada pela reação antígeno-anticorpo.

O ELISA, apresentado por Engvall e Perlmann em 1972, consiste em um imunoensaio heterogêneo, de fase sólida, realizado sobre superfície plástica na qual o antígeno é o adsorvido. Neste modelo, o antígeno imobilizado na fase sólida é incubado com o soro a ser testado para a pesquisa de anticorpos. O indicador é um conjugado constituído de uma enzima ligado a uma antigamaglobulina. A imunoglobulina conjugada pode ser classe específica (anti-IgG, anti-IgM, etc.) quando for necessário determinar a classe da imunoglobulina a ser pesquisada. A quantia de enzima fixada à fase sólida é proporcional à quantia de anticorpos presentes na amostra. Esta enzima é revelada pela adição de um substrato adequado, desenvolvendo cor, a qual é medida espectrofotometricamente. O limiar de reatividade, isto é, ponto de corte (do inglês "*cut off*"), é determinado em relação a um soro positivo ou negativo, testado nas mesmas condições da amostra, conforme as necessidades do teste em questão. (Gripenberg & Kurki, 1986).

Nos ensaios heterogêneos, as enzimas mais utilizadas são peroxidase, fosfatase alcalina, β -galactosidase, glicose oxidase, glucoamilase, anidrase carbônica e acetilcolinesterase. Nos ensaios homogêneos, são: lisozima, malato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, ribonuclease A e β -galactosidase (Sanchez, 1996).

Inicialmente, o ELISA foi usado para medir a ligação de anticorpos a proteínas e agentes microbianos (Bishai & Galli, 1978). Posteriormente, desenvolveram-se modificações para a detecção de antígenos celulares (Rockoff et al., 1979; Suter et al., 1980; Morris et al., 1982); e, mais recentemente, técnicas utilizando antígenos solúveis tem sido aplicadas na pesquisa de anticorpos anti-HLA. (Pouletty et al., 1994; Buelow et al., 1995-b).

Antígeno ou anticorpos foram inicialmente adsorvidos a plásticos como poliestireno, polivinil, polipropileno. O primeiro plástico a ser usado em imunoensaios foram tubos de poliestireno (Catt & Tregear, 1967). O sucesso dos métodos de ELISA se deu a partir do emprego de microplacas ou tubos de poliestireno como carreadores da fase sólida, por serem suportes de fácil sensibilização e proporcionar boa reprodutibilidade (Clark & Engval, 1988)

Usualmente, as placas de poliestireno são sensibilizadas através da adsorção passiva do antígeno para a realização de ELISA (Engvall e Perlmann, 1972, Cantarero et al., 1980).

Contudo, este tipo de adsorção pode não ser irreversível (Lehtonen & Viljanen., 1980). A fim de assegurar a ligação das células ao plástico, procedimentos como pré-sensibilização com poli-L-Lisine (PPL) (Cobbold & Waldmann 1981, Suter et al. 1980) e fixação com glutaraldeído (Rockoff et al. 1979) foram empregados.

Após a fixação do antígeno à fase sólida, sítios de ligações da superfície do plástico que restam não recobertos, necessitam ser bloqueados para evitar que adsorções não específicas à parede da microplaca, provoquem interações antígeno-anticorpo indesejadas, e levem, conseqüentemente, a resultados falso-positivos.

Com este objetivo, vários sistemas bloqueadores e procedimentos, como transferência das células ligadas ao anticorpo para uma nova placa antes da reação enzimática (Morris et al. 1982), têm sido propostos. O uso de proteínas não reativas, como: a caseína (Kenna et al., 1985); soro albumina bovina (Schonheyder & Andersen, 1984); leite em pó desnatado (Arunachalam et al,1990); e detergentes não iônicos, como: Tween-20, Triton X-100, em diferentes concentrações, têm sido empregados (Gripenberg & Kurki, 1986).

O método imunoenzimático por nós padronizado neste trabalho, CELISA, é usado para detectar antígenos de superfície celular, através da fixação de anticorpos específicos, sobre uma suspensão de Linfócitos T secos, revelados posteriormente por uma reação imunoenzimática.

O método imunoenzimático tem vantagens sobre as outras técnicas que pesquisam antígenos celulares, como a microlinfocitotoxicidade, uma vez que não necessita de células vivas para o ensaio; e estas células, após separadas e secas em microplacas para ELISA, podem permanecer armazenadas pelo período de aproximadamente seis meses a -20°C (Arunachalam et al., 1990), ou por mais de doze meses a - 80°C (Walker et al., 1992). Este método independe da lise por complemento, permite automação; e a leitura do teste é feito em espectrofotômetro, o que resulta em melhor padronização e reprodutibilidade, quando comparada a microlinfocitotoxicidade (Buelow et al., 1995^a).

Os linfócitos T, utilizados na sensibilização das placas, são células apropriadas para detectar anticorpos anti-HLA, por expressarem grande quantidade de antígenos HLA constitutivamente (Trucco et al., 1980), e ainda apresentarem baixa frequência de ligação inespecífica de imunoglobulina IgG, ao contrário dos linfócitos B. Estes, apesar de expressarem mais moléculas HLA classe I que os linfócitos T, além das moléculas de classe HLA classe II, também apresentam, constitutivamente, imunoglobulinas de superfície e receptores Fc ativos que ligam IgG livre, complexos antígeno-anticorpo, ou agregados de IgG (Garovoy et al., 1983) o que, obviamente, pode provocar ligações inespecíficas e interferir na pesquisa de anticorpos anti-HLA.

Plaquetas também têm sido usadas como células-alvo. Estas expressam 80.000 a 120.000 moléculas de HLA por célula, o que é comparável ao número de antígeno HLA

expresso por linfócitos. Contudo, a expressão dos antígenos HLA em plaquetas é mais variável do que em linfócitos (Kao et al., 1986). Por exemplo, antígenos HLA-10, B12 e B8 são menos expressos em plaquetas do que em linfócitos (Colombani et al., 1974). Além disto, as plaquetas também possuem receptores Fc ativos para IgG, podendo ligar imunocomplexos (Moore & Nachman, 1981). Provas cruzadas com plaquetas têm importância clínica nos casos de pacientes que se tornaram refratários a transfusões plaquetárias. Na maioria dos casos, esta refratariedade é causada por anticorpos anti-HLA (Dahlke & Weiss, 1984),

A detecção prévia de anticorpos contra linfócitos T, poderia prevenir a refratariedade plaquetária em relação a certo doador. Neste caso, o emprego do método CELISA poderia avaliar, simultaneamente, painéis de linfócitos e plaquetas de doadores disponíveis e habituais, antes de se administrar a transfusão.

OBJETIVOS

Considerando-se a importância de se definir a reatividade do soro contra painel de linfócitos (RCP), tanto na seleção de candidatos a receptores de transplantes renais como na seleção de doadores de plaquetas; e que o método de microlinfocitotoxicidade, atualmente disponível é de difícil execução num curto período de tempo, o presente trabalho teve por objetivos:

- 1- Padronizar o método imunoenzimático celular (CELISA) para a pesquisa de anticorpos anti-HLA, que não dependa da viabilidade celular, seja de fácil e rápida execução e passível de automação.
- 2- Comparar a sensibilidade e especificidade do método CELISA com o método clássico de microlinfocitotoxicidade dependente de anticorpo (CDC), e com o método clássico potencializado com adição de antigamaglobulina humana (CDC-AGH).
- 3- Avaliar a relevância clínica na evolução do transplante renal, dos resultados da RCP do soro das amostras pré-transplante, obtidas pelos métodos CDC, CDC-AGH e CELISA.

MATERIAL E MÉTODOS

1.1- AMOSTRAS DE SORO

1.1.1- SORO DE PACIENTES (CASUÍSTICA):

Para comparar a especificidade do método CELISA em relação aos métodos de citotoxicidade, foram analisadas um total de 144 amostras de soro de 40 pacientes renais crônicos, obtidas no momento da realização da prova cruzada pré-transplante, no período de 1993 a 1995, encaminhadas ao laboratório de Histocompatibilidade pela Disciplina de Nefrologia-FCM-UNICAMP; uma amostra de soro de 10 gestantes, colhida no primeiro trimestre de gestação, e uma amostra de soro de 7 pacientes com história de aborto espontâneo recorrente, obtida após terapia imunizante com linfócitos do esposo, encaminhadas pela Disciplina de Tocoginecologia-FCM-UNICAMP. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da realização dos testes.

1.1.2- SOROS PADRÕES:

Padrões positivos:

Foram empregados soros com reatividade contra painel de linfócitos acima de 90% pelo método de microlinfocitotoxicidade clássica, para controle positivo, e aloantissoros com especificidades conhecidas (anti-HLA A23 e A 24) para a determinação da sensibilidade do teste CELISA.

Padrões negativos:

Foram empregados, como controle negativo, amostras individuais e uma mistura de 20 amostras de soro humano normal (SHN), obtidas de doadores de sangue do sexo masculino, sem história de transfusão sangüínea prévia.

1.1.3- TRATAMENTO DOS SOROS

Pacientes com desordens de coagulação, ou submetidos à terapia com heparina (dialisados), podem apresentar traços de fibrina presentes no soro separado para a análise, levando a resultados falso-positivos (Keros et al., 1982). Para retirada destes restos de fibrina, as amostras foram armazenadas a -20°C e imediatamente antes da realização dos testes foram descongeladas e tratadas com trombina (Thromboquik- OrganonTeknilka Nº 35515). Para este tratamento, incubou-se 0,1 ml do soro com 0,02µl de trombina (aproximadamente

2mg de trombina pôr mililitro) em banho-maria a 37°C, por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 400g por 5 minutos (Keros et al., 1982), ou filtradas em papel filtro (Whatman 42) para remoção da fibrina formada.

1.2- SUSPENSÃO ANTIGÊNICA

1.2.1 - POPULAÇÃO PURIFICADA DE LINFÓCITOS T .

Foram utilizadas suspensões enriquecidas em linfócitos T tipados para os antígenos classe I do locus de histocompatibilidade (HLA-A e B).

Do sangue periférico, colhido por punção venosa, acrescentando-se, para cada 10 ml de sangue, 0,1 ml de heparina (Liquemine 5000 UI/ml, Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos - S.A., Rio de Janeiro, Brasil), foram separadas as células mononucleares por gradiente de densidade, através de centrifugação, usando Ficoll-Hypaque.

O sangue diluído ao meio com solução fisiológica foi centrifugado, à temperatura ambiente, a 400g por 30 minutos, na proporção de três partes de sangue diluído para uma de gradiente (Boyum, 1968). A nuvem de leucócitos formada entre plasma e gradiente foi, então, separada por aspiração com pipeta Pasteur e lavada duas vezes, à temperatura ambiente, por centrifugação (200g por 10 minutos) com solução salina balanceada de Hanks (Hanks'BSS), pH 7,2. A seguir, contaminantes, como hemácias, foram eliminados por lise, adicionando-se algumas gotas de água destilada no momento de ressuspender o botão de leucócito formado. As plaquetas foram eliminadas através de agregação por trombina ressuspendendo-se o botão de células em 1ml de Hanks'BSS, adicionando-se 100µl de trombina; centrifugando-se por 1 minuto a 200g. Após desprezar o sobrenadante, o botão celular foi ressuspenso em 1ml de Hanks'BSS.

A purificação dos linfócitos T foi obtida, empregando-se um cotonete constituído de 0,15mg de fibra de nylon (Robbins Scientific, Combed, Scrubbed Nylon, Wool. , 1x100g, Type 200), a qual foi previamente imersa, 30 minutos a 37°C em um tubo com solução de Hanks'BSS contendo 5% de soro bovino fetal, (Gibco Europe). Em seguida, ela foi enrolada, com movimentos circulares, em uma vareta de madeira com aproximadamente 2 mm de diâmetro e 14 cm de comprimento.

Os linfócitos totais obtidos por gradiente de Ficoll-Hypaque foram ressuspensos em 1 ml de Hanks'BSS, e então perfundidos neste cotonete.

O cotonete contendo a suspensão de leucócitos, foi incubado por trinta minutos, a 37°C, em posição vertical, e, a seguir, foi lavado com 20 ml de Hanks'BSS acrescido de 5% de soro bovino fetal (SBF) a 37°C. Nos primeiros 10 ml de solução, foram liberados os linfócitos T purificados. Os linfócitos B permaneceram retidos na fibra de nylon.

A solução com células T foi centrifugada a 200g por 10min. Após desprezar o sobrenadante por inversão, o botão celular foi ressuspensionado em 1 ml de Hanks'BSS, e a viabilidade celular foi verificada através da incorporação do corante vital azul Tripán (Matheson/Coleman & Bell, Norwood, USA), diluído a 1:400 em solução fisiológica, misturando-se volumes iguais de suspensão celular e solução corante. Para a realização dos testes de microlinfocitotoxicidade, se utilizaram apenas suspensões com linfócitos T com mais de 90% de viabilidade.

1.2.2-CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS UTILIZADAS PARA A AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CONTRA PAINEL, EMPREGANDO-SE OS MÉTODOS DE CITOTOXICIDADE E CELISA.

Na sensibilização das placas de ELISA para a realização da prova cruzada, foram utilizadas células recém-separadas do sangue periférico. No estudo da reatividade contra painel, foram utilizadas placas de ELISA, contendo triplicatas de linfócitos T, de 28 diferentes indivíduos previamente mantidos viáveis em nitrogênio líquido.

As células a serem congeladas foram ressuspensas em Hanks'BSS, em concentração de até 20×10^6 linfócitos /ml. A suspensão foi resfriada a 4°C e misturada, volume a volume, com solução de DMSO (Dimetilsulfóxido- Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) a 20 % em solução salina balanceada de Hanks a 4°C. Imediatamente após, a mistura foi introduzida em frascos plásticos (volume 0,5ml) e mantidos a -80°C, por, no mínimo, 2 horas, para obter queda gradual de temperatura. A seguir, os frascos foram mergulhados em nitrogênio líquido.

Para descongelamento, os frascos foram colocados por 30 segundos em banho-maria, a 37°C. A seguir, o conteúdo foi transferido para tubos de ensaio cônicos, contendo 2 ml de Hanks'BSS enriquecido com 5% de soro bovino fetal. A suspensão foi, então, centrifugada (200g por 10 minutos), a temperatura ambiente, e lavada por uma vez em Hanks'BSS.

Nos testes de microlinfocitotoxicidade foram utilizadas células com viabilidade superior a 90%; e, no testes CELISA, foram utilizadas as mesmas suspensões celulares desidratadas.

1.3.-REAÇÃO DE MICROLINFOCITOTOXICIDADE

1.3.1-REAÇÃO DE MICROLINFOCITOTOXICIDADE CLÁSSICA DEPENDENTE DE COMPLEMENTO (CDC)

A microlinfocitotoxicidade clássica consiste na incubação prévia de linfócitos viáveis com soro do paciente e posterior incubação com soro de coelho como fonte de complemento. São consideradas reações positivas, as escavações da placa de microlinfocitotoxicidade onde mais de 50 % dos linfócitos se encontram mortos. A observação da porcentagem de células

mortas é feita através da adição do corante vital azul tripan em microscopia óptica comum.

O teste foi realizado em placas de microlinfocitotoxicidade (Falcon Plastics Division of B. D. Laboratories Inc., Los Angeles, USA) e os reagentes distribuídos com microseringas munidas de distribuidor repetitivo (Hamilton Co. Inc Whittier, California, USA).

A cada escavação da placa, já contendo um microlitro do soro, foi adicionado um microlitro de suspensão de linfócitos T, ajustada à concentração de 2×10^6 por ml, em solução de Hanks'BSS. Após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente (22-25°C), foram adicionados 5 microlitros de soro de coelho, como fonte de complemento. Após incubação por mais 60 minutos, à temperatura ambiente, o excesso de complemento foi retirado por inversão brusca da placa e um microlitro de solução de azul tripan foi adicionado a cada escavação. Após pelo menos 30 minutos, foi procedida a leitura em microscópio óptico comum com aumento de 100 vezes (Terasaki & Mc Clelland, 1964).

1.3.2- REAÇÃO E MICROLINFOCITOTOXICIDADE CLÁSSICA POTENCIALIZADA PELA ADIÇÃO DE ANTIGAMAGLOBULINA HUMANA (CDC-AGH)

A adição de antiglobulina humana (AGH) (Soro de Coombs- Biotest S/A) na prova de microlinfocitotoxicidade foi proposta com a finalidade de aumentar sua sensibilidade (Jonhson et al..1972;Cross et al.; 1976). Para isto, antes de se adicionar o complemento, lavou-se três vezes as células contidas nas escavações da placa Terasaki, completando-se cada escavação com solução de Hanks'BSS, com auxílio de uma pipeta Pasteur, que, após 5 minutos, era retirada com auxílio de compressa de gaze. Após a última lavagem, adicionou-se 1µl da AGH, previamente titulada e, após exatamente 1 minuto, foi adicionado o soro de coelho como fonte de complemento. Seguiu-se, então, os mesmos procedimentos descritos para a prova de microlinfocitotoxicidade clássica.

1.3.3-PROVA CRUZADA ("CROSSMATCH")

Além do emprego do método CELISA, a pesquisa de anticorpos citotóxicos, no soro do receptor do transplante renal, contra antígenos linfocitários do provável doador, também foi avaliada através da reação de microlinfocitotoxicidade clássica dependente de complemento (CDC) e potencializada pela adição de antigamaglobulina humana (CDC-AGH). Nestes testes, foram realizados em triplicatas, empregando-se 1,2,3, microlitros da amostra de soro não diluída e 1µl de soro diluído a 1:2, 1:4, em soro humano normal de indivíduo não transfundido do grupo sangüíneo AB, diluído ao meio em solução de Hanks'BSS. Em adição, foram inclusos no teste, controles negativo (soro humano normal do grupo AB não diluído) e positivo (mistura de soros anti-HLA multiespecífico, contendo mais de 90% de reatividade contra

painel de linfócitos avaliados pelo teste de microlinfocitotoxicidade). As mesmas células foram utilizadas para sensibilização imediata das placas de ELISA, para posterior realização da prova cruzada pelo método CELISA..

1.3.4-REATIVIDADE CONTRA PAINEL DE LINFÓCITOS (RCP)

A reatividade dos soros de pacientes renais crônicos e com história de aborto espontâneo recorrente (AER) imunizadas com linfócitos do esposo, foram avaliados através da reação de microlinfocitotoxicidade clássica e potencializada por antigamaglobulina humana, frente a suspensões de linfócitos T de, pelo menos, 28 indivíduos normais, previamente selecionados, de modo a abranger o maior número possível de diferentes especificidades HLA conhecidas. Para as provas de microlinfocitotoxicidade, o painel de células foi constituído por células viáveis recém-separadas do sangue periférico. Estas mesmas células foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido até o momento da sensibilização das placas (descrito a seguir) para avaliação do painel pelo método CELISA.

A reatividade do soro foi definida pela percentagem de reações positivas frente a células do painel nos três métodos.

1.4.-PREPARAÇÃO DAS PLACAS PARA CELISA

1.4.1- SENSIBILIZAÇÃO DAS MICROPLACAS PARA ELISA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR ADEQUADA.

A população purificada de linfócitos T, ressuspensa em 1ml de Hanks, foi lavada 3 vezes com PBS pH 7,2. Concentrações variando entre 500.000 a 500 células, por escavação, foram colocadas em cavidades da microplaca de poliestireno de fundo chato para ELISA, tendo-se o cuidado de manter a solução homogênea por constante agitação.

As placas contendo a suspensão de linfócitos foram mantidas à temperatura ambiente (24°C), sob ventilação forçada, por pelo menos até 16 horas ou até ficarem completamente secas. As placas foram usadas imediatamente, ou seladas e armazenadas a -20°C por até 6 meses.

Inicialmente, para a padronização dos demais fatores envolvidos no método CELISA, utilizou-se a concentração de 5×10^4 células/escavação (50µl de 1×10^6 linfócitos T por ml), recomendada por outros autores que estudaram sistemas semelhantes (Schlosser et al., 1991; Effros et al., 1985; Morris, et al., 1982).

1.4.2 - PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO BLOQUEADORA DOS SÍTIOS LIVRES DA MICROPLACA

Sítios de ligações na superfície da microplaca, que restam não recobertos após a fixação do antígeno à fase sólida, permitem adsorção inespecífica à parede da microplaca, principalmente de imunoglobulinas, podendo levar a resultados falso-positivos nas reações imunoenzimáticas, devido à imobilização inadequada do anticorpo marcado, revelador da reação. O princípio do uso de soluções bloqueadoras reside em recobrir estes sítios com proteínas não humanas, associado ao uso de detergentes não-iônicos; impedindo, assim, que a antiglobulina humana marcada (conjugado) se ligue inespecificamente.

Foram analisadas oito diferentes soluções bloqueadoras, variando na sua composição quanto à presença e concentração de detergente não iônico Triton-x-100 (Sigma Chemical Company, / St. Louis, USA), leite desnatado (Molico®, Nestlé, São Paulo, Brasil), mistura de soro de Coelho, inativado, em banho-maria, a 56°C por 30 minutos, em solução tampão 10mM TRIS-HCl pH 7,6 - Tris (hidroximetil)aminometano (Sigma C. Company-T 1378), HCL P. A. (Merck Laboratórios S.A, Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil).

As soluções foram testadas sobre três diferentes marcas de microplacas para ELISA Costar-3590 H (Costar Corporation, Cambridge, MA), Nunc-Immuno 442404 (Nunc-2000, Naperville, IL), Immunolon-1, (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) não sensibilizadas e sensibilizadas com 50µl da suspensão de linfócitos T, na concentração de 1×10^6 /ml (em tampão PBS), tendo, como parâmetros, um soro conhecidamente positivo pela técnica de microlinfocitotoxicidade (RCP > 90%) e, como controle negativo, uma mistura de 20 soros humanos normais de indivíduos do sexo masculino, doadores de sangue não transfundidos, que foram adicionados na quantidade de 50µl, diluídos ao meio no mesmo tampão bloqueador. A avaliação foi feita para cada uma das soluções, através da leitura da densidade óptica (DO) dos soros, em espectrofotômetro Titertek multiscan plus, utilizando filtro com comprimento de onda de 492nm.

1.5 - SOLUÇÃO DE LAVAGEM

Em uma reação imunoenzimática, anticorpos não fixados especificamente à fase sólida, neste caso, aos linfócitos T adsorvidos à placa, precisam ser removidos. Para tanto, foram testadas duas soluções de lavagem, diferindo quanto à presença ou não de detergente não iônico Triton-X-100 no tampão Tris-HCl.

1.6- TITULAÇÃO DO CONJUGADO E TEMPO DE INCUBAÇÃO COM O SUBSTRATO.

Foi utilizado conjugado comercial, anticorpo de cabra anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma Chemical Company, St. Louis), diluído a 1/2000 em tampão Tris- BSA 1% (Sigma Chemical Company- St Louis -nº6789).

O título do conjugado utilizado no teste CELISA foi determinado, avaliando-se as densidades ópticas obtidas com diluições que variaram de 1/200 a 1/8000, em dois diferentes tempos de incubação com o substrato, sobre placas sensibilizadas com a concentração de 5×10^4 células por escavação, frente a soros controles positivo e negativo.

1.7 - EXECUÇÃO DO TESTE CELISA

Após se definirem a concentração celular, o tampão bloqueador, a solução de lavagem, o título do conjugado e os tempos de incubações, o teste CELISA foi padronizado como descrito a seguir.

Foram utilizadas placas sensibilizadas com triplicatas das suspensões linfocitárias, adicionadas na concentração de 5×10^4 células por escavação (50 μ l de 1×10^6 linfócitos / ml, em PBS) e mantidas congeladas a -20°C .

No início do teste, aguardou-se até que as placas atingissem a temperatura ambiente, na qual todos os procedimentos do teste foram realizados.

Logo a seguir, à cada escavação, foram adicionados 200 μ l de tampão PBS-Azida 0,1%, pH 7,2, para reidratação das suspensões celulares.

Após 10 minutos, foi desprezado o tampão reidratante, por inversão brusca e batidas repetidas da placa invertida sobre papel absorvente.

Então, sobre a suspensão celular, foram adicionados 200 μ l de solução bloqueadora, que após, 45 minutos de incubação, foi retirada, utilizando-se o mesmo processo descrito anteriormente.

A seguir, com ajuda de automação ou de forma manual, a placa foi lavada por três vezes com solução de lavagem (TRIS-HCL, 0,05% Triton-X-100), adicionando-se 200 μ l da solução em cada cavidade da placa a cada lavagem, tendo-se o cuidado de observar um tempo mínimo de 30 segundos, antes da retirada da solução por inversão brusca e absorção em papel absorvente.

Posteriormente foram adicionados 50 μ l do soro a ser testado e dos soros controles negativo e positivo, diluídos a 1/2 no tampão bloqueador inicial, sobre as células fixadas à microplaca.

Após 45 minutos de incubação, repetiu-se o procedimento de três lavagens com tampão TRI-HCL, 0,05% Triton-X-100, para retirada das substâncias séricas não ligadas aos

antígenos de superfície celular.

Adicionou-se, então, 50µl do conjugado enzimático (anti- IgG humana conjugado com peroxidase) diluído a 1/2000, incubando-se por mais 30 minutos.

O conjugado enzimático não ligado especificamente foi retirado através de mais três lavagens com tampão TRI-HCL, 0,05% Triton-X-100. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 50µl de solução cromógena OPD (o-phenilenodiamina 2 HCL, 1,0 mg/ml (Sigma Chemical Company nº p-8287), em tampão citrato-fosfato, 0,05M, pH 5,0 contendo 0,03% de perborato de sódio - Sigma Chemical Company, St. Louis, USA- nº P 4922); solução esta que foi preparada no momento do uso. Após 15 minutos ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 50µl de H₂SO₄ 1N.

Avaliou-se a intensidade de cor desenvolvida em leitor de placa para ELISA marca Titertek MultiScan- Plus, em comprimento de onda de 490nm.

1.8 - AVALIAÇÃO DO TESTE

O limiar de reatividade ("cut off") foi determinado após análise da reatividade de soros negativos para aloanticorpos leucocitários, obtido de doadores de sangue normais do sexo masculino, não transfundido. Para controlar as variações individuais destas amostras, passou-se a considerar, como limiar de reatividade, o valor médio das absorbância das triplicatas obtidas em presença do controle negativo, constituído por uma mistura de soro humano normal de 20 indivíduos, acrescida de dois desvios-padrões. Este ponto de corte foi definido pela análise das variações individuais, intratestes, das amostras negativas e positivas testadas em triplicata.

1.9 - REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade pode ser avaliada intratestes ou interteste. A reprodutibilidade intrateste refere-se à repetição do teste, ao mesmo tempo por ensaios em duplicata ou triplicata; e a reprodutibilidade interteste, à repetição da mesma amostra em testes realizados em ocasiões diferentes.

1.9.1- REPRODUTIBILIDADE INTRATESTE

Para se avaliar a reprodutibilidade intrateste, foram observadas as variações das densidades ópticas das triplicatas obtidas com testes CELISA, realizado com as amostras de soros de pacientes renais crônicos, reagentes e não reagentes, frente a suspensões de linfócitos T de 15 diferentes doadores cadáveres, além das obtidas frente aos soros controles

positivos e negativos. Os resultados obtidos no teste CELISA foram posteriormente comparados aos obtidos nos testes de microlinfocitotoxicidade clássico e potencializado com antigamaglobulina humana, realizados paralelamente.

1.9.2 ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES ANTIGÊNICAS NA REPRODUTIBILIDADE DO TESTE CELISA E REPRODUTIBILIDADE INTERTESTE

Para estudo da estabilidade antigênica das suspensões de linfócitos T, foram utilizadas microplacas de ELISA, tendo, como antígeno as mesmas populações celulares empregadas no método de citotoxicidade no momento da prova cruzada pré-transplante renal, armazenadas a -20°C. As provas cruzadas pelo método CELISA foram realizadas logo após a sensibilização, e 6 meses depois, para verificação da estabilidade da suspensão antigênica e variação interensaio. Os resultados obtidos foram comparados aos obtidos pelo método de microlinfocitotoxicidade clássico e potencializado com AGH.

1.10-ESTUDO DA SENSIBILIDADE DO MÉTODO CELISA

Para o estudo da sensibilidade do teste de CELISA, se utilizaram duas populações celulares de linfócitos T: uma portando antígeno HLA- A24, e outra HLA-A23 e dois soros com especificidades conhecidas, anti-HLA A23, e anti-HLA A24, definidas pelo método de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC). Diluições destes soros foram avaliadas, concomitantemente, pelo método CDC, potencializado pela adição de antigamaglobulina humana (CDC-AGH) e CELISA.

1.11- ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DO MÉTODO CELISA

Para a análise da especificidade, foram utilizados soros provenientes de 10 gestantes normais, obtidos no primeiro trimestre de gravidez e soro de 96 pacientes em hemodiálise crônica, num total de 226 comparações entre os métodos CELISA CDC e CDC-AGH.

Os soros de gestantes foram avaliados frente a suspensões celulares de, pelo menos, 10 diferentes indivíduos; e os soros dos pacientes renais crônicos foram avaliados frente a suspensões celulares de, pelo menos, um indivíduo, obtidas por ocasião da prova cruzada pré transplante com doador cadáver

As placas para realização do teste CELISA foram sensibilizadas com as mesmas células usadas no teste CDC e CDC-AGH.

1.12- APLICAÇÃO DO MÉTODO CELISA PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CONTRA PAINEL DE LINFÓCITOS

Para a avaliação da reatividade do soro contra painel de linfócitos (%RCP) e caracterização da especificidade anti-HLA dos anticorpos, foram conservadas suspensões enriquecidas em linfócitos T, em nitrogênio líquido de 28 diferentes indivíduos tipados para os antígenos HLA-A e B. Estas células foram submetidas ao teste de microlinfocitotoxicidade clássica, potencializada com AGH, e CELISA.

Para a realização do teste empregando-se o método CELISA, as placas foram previamente sensibilizadas, com triplicatas de cada umas das mesmas 28 diferentes suspensões de células T utilizadas nos testes de microlinfocitotoxicidade. Das 3 escavações que compunham a triplicata, duas foram utilizadas para o soro teste e uma para o soro controle negativo (mistura de soro humano normal), tendo, assim, cada célula seu controle negativo individual. Cada microplaca teve, também, três escavações sensibilizadas com uma suspensão celular qualquer, para ensaio, em duplicata, do soro controle positivo, e uma escavação livre de qualquer soro, para controle da retirada do conjugado inespecificamente ligado, ou que restou livre após os procedimentos de lavagem.

O limiar de positividade ("cut off") foi definido pela média das densidades ópticas do controle negativo, observado para cada célula, acrescido de mais 2 desvios-padrões.

O presente estudo avaliou amostras de soros de 7 pacientes com história de aborto espontâneo recorrente (AER), submetidas à terapia imunizante com linfócitos do esposo e soro de pacientes renais crônicos politransfundidos. No caso de pacientes com AER, tanto a paciente como o esposo foram previamente tipados para os antígenos HLA A e B.

O painel em que foram avaliados os soros das pacientes com AER continha 21 diferentes especificidades HLA, classe I, sem considerar os antígenos com alta incidência de reação cruzada – "splits" (A1, A2, A3, A9, A10, A11, Aw19, A28, B5, B7, B8, B12, B13, B15, B16, B17, B18, B21, B22, B27, B35).

O painel em que foram avaliados os soros de pacientes renais crônico continha 23 diferentes especificidades HLA, classe I (A1, A2, A3, A9, A10, A11, Aw19, A28, B5, B7, B8, B12, B13, B14, B15, B16, B17, B18, B21, B35, B37, B40, B53).

Nos anexos 4 e 5 estão representadas as tipagens HLA-A e B, definidas pelas especificidades privadas (Splits), de cada célula utilizada no painel e das pacientes com AER e seus cônjuges.

Nos métodos CDC e CDC-AGH foram utilizados linfócitos viáveis, enquanto que, no método CELISA, empregaram-se linfócitos desidratados e adsorvidos em placas de ELISA.

1.13 - AVALIAÇÃO DA RELEVÂNCIA CLÍNICA DA PROVA CRUZADA E REATIVIDADE CONTRA PAINEL NA EVOLUÇÃO DO ENXERTO RENAL AVALIADAS PELO MÉTODO CELISA

A prova cruzada, empregando-se o método CELISA, foi realizada entre as amostras pré-transplante de 18 pacientes submetidos a transplante de rim de doador cadáver.

Para a avaliação da RCP, foi realizado um estudo retrospectivo com as amostras pré-transplante de 22 pacientes, sendo que 6 receberam rim de irmão HLA parcialmente idêntico e os demais, de doador cadáver. Neste trabalho foram incluídos 9 transplantes com boa evolução e 13 com má evolução, sendo que, em 11, a perda foi devido a fatores imunológicos.

1.14 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS:

Em todos os testes, fixou-se nível para rejeição da hipótese de validade em "p" menor ou igual a 0,05.

Foi empregado o teste não paramétrico do Qui-quadrado para comparações das variáveis qualitativas (tabelas de contingência) dentre duas amostras independentes (Qui-quadrado com correção de Yates) entre os métodos CELISA, CDC e CDC-AGH.

Os testes paramétricos de Análise de Variância para dois fatores com repetição foram utilizados para avaliar o tipo de placa de ELISA, soluções bloqueadoras e suas interações; e o teste T de Student para avaliar diferenças entre duas amostras, presumindo variâncias equivalentes.

RESULTADOS

2.1- PROCESSO DE BLOQUEIO DOS SÍTIOS LIVRES DA MICROPLACA

Diferente da interação antígeno-anticorpo, o processo de adsorção do antígeno à superfície sólida não é específico. A superfície do plástico, não recoberta após a sensibilização da microplaca com o antígeno, pode permitir a ligação direta de proteínas como a imunoglobulina, durante a incubação com o soro, ou do conjugado. Esta adsorção inespecífica à parede da microplaca pode levar a resultados falso positivos, verificado através do aumento do valor da absorbância, na ausência da reação específica antígeno anticorpo.

A tabela 1 mostra as densidades ópticas obtidas (DO), quando testados três diferentes tipos de microplacas para ELISA (Costar®, Immunolon-1® e Nunc®), submetidas a 8 soluções bloqueadoras com composição variada, a fim de se verificar a eficiência do bloqueio de sítios de ligações inespecíficas à superfície plástica das microplacas antes da sensibilização com a suspensão de células T. Para avaliar a eficiência do bloqueio, após o tratamento com as soluções bloqueadoras, foram adicionados 50 microlitros de soro humano normal em cada escavação da placa e seguidas as todas etapas de um teste imunoenzimático. Como não havia antígeno adsorvido, não se esperou a ligação de anticorpos conjugados a enzima, e, portanto, nenhuma reação colorimétrica com a adição do substrato OPD revelado pela intensidade da densidade óptica medida em espectrofotômetro. Entretanto, como pode ser observadas na tabela 01, reações inespecíficas ocorreram com as 8 soluções bloqueadoras, nos 3 tipos de placas utilizadas.

A aplicação do teste de análise de variância para dois fatores com repetição (triplicatas) mostrou diferenças estatisticamente significantes nos valores das DO entre os tipos de placas ($p = 1,3 \times 10^{-22}$) e soluções bloqueadores ($p = 2,8 \times 10^{-22}$) utilizadas. A análise mostrou, também, interações significantes entre o tipo de placa e solução bloqueadora ($p = 1,3 \times 10^{-14}$).

Analisando-se separadamente cada tipo de placa, constatou-se que, com a marca Nunc®, foram obtidos os menores valores de DO, independentemente do tipo de tampão bloqueador utilizado. Entre as 24 observações realizadas para cada tipo de placa, as DO variaram de 0,001 a 0,051 (média = 0,013) com a placa Nunc®; de 0,32 a 0,547 (média = 0,167) com a placa Immunolon-1®; e de 0,048 a 0,469 (média = 0,155) com a placa Costar®.

Não foram reveladas diferenças estatisticamente significantes entre as DO observadas entre as placas de marcas Immunolon-1® e Costar®, aplicando-se o teste T de Student para duas amostras, presumindo variâncias equivalentes. Entretanto, ambas mostraram valores de D.O. maiores, ao se compararem os valores observados com a placa da marca Nunc®. Os valores de p (bicaudal) foram de $1,3 \times 10^{-7}$, entre as placas Costar® e Nunc®; e de $5,3 \times 10^{-6}$,

entre as placas Immunolon-1® e Nunc®.

A solução bloqueadora número 5 (constituída de tampão Tris-HCl com 0,1% de Triton-X100, 1% de soro de coelho e 3% de leite em pó) foi a que proporcionou os menores valores de D.O. , tanto com a placa Costar® (média = 0,056), como com a placa Immunolon-10 (média 0,040). Todavia, mesmo com esta solução bloqueadora, as D.O. observadas com estas placas foram maiores ($p = 0,001$) quando comparadas com a placa da marca Nunc®.

Estas mesmas soluções bloqueadoras foram avaliadas nos 3 tipos de placa adsorvidas com 50 000 linfócitos T por escavação na presença de soros controles negativo ou positivo (soro com, pelo menos, 90% de reatividade em painel de linfócitos pelo método de microlinfocitotoxicidade). Como a situação ideal seria aquela em que se observassem os maiores valores de D.O. em presença de controle positivo (CP); e menores em presença do controle negativo (CN), foram calculados os índices CP/CN para facilitar as análises. Os dados estão expressos na tabela 02.

A aplicação do teste de análise de variância para dois fatores com repetição (triplicatas) mostrou diferenças estatisticamente significantes nos valores dos índices CP/CN, apenas entre os tipos de solução bloqueadoras ($p = 1,2 \times 10^{-25}$); mostrando que as diferenças na capacidade de adsorção inespecífica entre os tipos de placas tendem a desaparecer, quando as mesmas são adsorvidas com as suspensões celulares.

As soluções bloqueadoras em que foram observados os maiores índices CP/CN foram as de número 1, 5 e 7. A análise de variância não mostrou diferença estatisticamente significativa entre elas. Os valores dos índices CP/CN variaram de 1,81 a 2,0 (média = 0,90), entre as soluções 1,5 e 7 e foram maiores que os observados com as demais soluções, 2,3,4,6 e 8, que variaram de 1,16 a 1,78 (média = 1,60).

Embora as soluções 1 e 7 tenham se mostrado eficientes como bloqueadoras, optou-se pelo uso da solução número 5, constituída de tampão Tris-HCl, pH 7,6 com 0,1% de Triton-X100, 1% de soro de coelho e 3% de leite em pó desnatado, pois foi a que proporcionou os maiores índices CP/CN médios (2,0 com a placa Costar® e 1,9 com a placa Immunolon-1® e Nunc®), e, portanto, mais eficiente para bloquear a adesão inespecífica de IgG sérica ou mesmo do conjugado tanto à superfície plástica, como a possíveis receptores celulares.

Uma vez que, com o uso destes tampões bloqueadores, as diferenças entre os tipos de placas desapareceram, foi possível se realizarem testes em placas Costar® nº3590-H, disponíveis no laboratório.

TABELA-01

Densidades ópticas obtidas com diferentes soluções bloqueadoras em microplaca para ELISA na presença de soro humano normal* e na ausência de suspensão antigênica

Solução Bloqueadora		Placas de ELISA Avaliadas		
		Costar®	Immunolon-1®	Nunc®
1	TRIS-HCl	0,177	0,138	0,015
	0,2 % Triton-X100	0,189	0,114	0,002
	1,0 % soro de coelho	0,102	0,158	0,003
2	TRIS-HCl	0,187	0,260	0,051
	0,1 % Triton-X100	0,176	0,263	0,009
	1,0 % soro de coelho	0,146	0,167	0,010
3	TRIS-HCl	0,469	0,547	0,008
	0,05 % Triton-X100	0,380	0,546	0,001
	1,0 % soro de coelho	0,353	0,404	0,013
4	TRIS-HCl	0,267	0,189	0,018
	0,2 % Triton-X100	0,143	0,193	0,002
		0,135	0,166	0,002
5	TRIS-HCl	0,067	0,052	0,011
	0,1 % Triton-X100	0,048	0,036	0,011
	1,0% soro de coelho + 3,0 % leite em pó	0,053	0,032	0,007
6	TRIS-HCl	0,060	0,072	0,018
	0,05 % Triton-X100	0,045	0,052	0,002
	1,0% soro de coelho + 3,0 % leite em pó	0,047	0,040	0,032
7	TRIS-HCl	0,154	0,118	0,014
	0,1 % de Triton-X100	0,125	0,117	0,024
	3,0 % leite em pó	0,119	0,135	0,020
8	TRIS-HCl	0,114	0,070	0,011
	5,0 % leite em pó	0,082	0,065	0,016
		0,083	0,066	0,008

*Soro humano normal (mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos)

TABELA-02

Densidades ópticas obtidas com Diferentes Soluções Bloqueadoras em placa para ELISA Sensibilizadas com 5×10^4 Linfócitos T por cavidade

Solução Bloqueadora		Placas de ELISA Utilizadas								
		Costar®			Immunolon-1®			Nunc®		
		CN*	CP**	CP/CN	CN	CP	CP/CN	CN	CP	CP/CN
1	TRIS-HCl	0,499	0,910	1,82	0,455	0,902	1,98	0,438	0,903	2,06
	0,2 % Triton-X100	0,459	0,889	1,94	0,456	0,905	1,98	0,483	0,907	1,88
	1,0 % soro de coelho	0,500	0,900	1,80	0,498	0,897	1,80	0,469	0,899	1,92
2	TRIS-HCl	0,579	0,927	1,60	0,553	0,922	1,67	0,580	0,921	1,59
	0,1 % Triton-X100	0,514	0,898	1,75	0,532	0,867	1,63	0,534	0,895	1,68
	1,0 % soro de coelho	0,487	0,890	1,83	0,485	0,876	1,81	0,489	0,894	1,83
3	TRIS-HCl	0,454	0,800	1,76	0,456	0,801	1,76	0,463	0,799	1,73
	0,05 % Triton-X100	0,455	0,815	1,79	0,449	0,817	1,82	0,453	0,811	1,79
	1,0 % soro de coelho	0,490	0,823	1,68	0,450	0,800	1,78	0,489	0,802	1,64
4	TRIS-HCl	0,602	0,789	1,31	0,600	0,700	1,17	0,602	0,704	1,17
	0,2 % Triton-X100	0,611	0,800	1,31	0,604	0,699	1,16	0,608	0,700	1,15
		0,600	0,804	1,34	0,605	0,700	1,16	0,603	0,702	1,16
5	TRIS-HCl	0,384	0,700	1,82	0,345	0,697	2,02	0,388	0,702	1,81
	0,1 % Triton-X100	0,341	0,722	2,12	0,386	0,688	1,78	0,377	0,697	1,85
	1,0% soro de coelho + 3,0 % leite em pó	0,348	0,716	2,06	0,377	0,694	1,84	0,354	0,700	1,98
6	TRIS-HCl	0,382	0,650	1,70	0,426	0,655	1,54	0,400	0,654	1,635
	0,05 % Triton-X100	0,388	0,654	1,69	0,418	0,609	1,46	0,402	0,633	1,57
	1,0% soro de coelho + 3,0 % leite em pó	0,392	0,665	1,70	0,427	0,603	1,41	0,410	0,621	1,51
7	TRIS-HCl	0,375	0,712	1,90	0,380	0,700	1,84	0,376	0,701	1,862
	0,1 % de Triton-X100	0,379	0,700	1,85	0,388	0,721	1,86	0,373	0,770	2,06
	3,0 % leite em pó	0,380	0,734	1,93	0,409	0,708	1,73	0,400	0,700	1,75
8	TRIS-HCl	0,402	0,500	1,24	0,400	0,556	1,39	0,405	0,501	1,24
	5,0 % leite em pó	0,403	0,503	1,25	0,405	0,544	1,34	0,407	0,508	1,25
		0,406	0,576	1,42	0,412	0,568	1,38	0,410	0,520	1,27

* CN = Controle Negativo (mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos)

** CP = Controle Positivo (amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T pela técnica de microlinfocitotoxicidade)

2.2- DETERMINAÇÃO DO TAMPÃO DE LAVAGEM

Nos testes imunoenzimáticos heterogêneos, é de vital importância a completa retirada do sistema, de anticorpos anti-imunoglobulina conjugados à enzima que não se fixaram ao primeiro anticorpo, ou que aderiram inespecificamente à superfície celular, antes da adição do substrato, alvo da ação enzimática. Nesta padronização, foi avaliada a eficiência da inclusão de 0,05% de Triton-X-100, um detergente não iônico, na solução de lavagem constituída de tampão TRIS-HCL, com pH 7,6.

Para estudar a ação deste detergente, foram avaliadas as densidades ópticas (D.O.) no teste de CELISA, realizado em placas sensibilizadas com 50000 linfócitos por escavação frente a soros controles negativos e positivo.

Na tabela 03, estão representadas as triplicatas das densidades ópticas obtidas apenas na presença do conjugado; na presença dos controles negativo (CN) e positivo (CP); bem como o índice CP/CN e a diferença [CP – CN].

TABELA 03

Densidades ópticas obtidas segundo a adição de Triton-X-100 na solução de lavagem

Solução de Lavagem	Controles*				
	Conjugado	Negativo	Positivo	CP/CN	CP-CN
TRIS-HCL + 0,05% de Triton-X100	0,136	0,139	0,505	3,63	0,366
	0,128	0,149	0,402	2,70	0,253
	0,117	0,142	0,408	2,87	0,266
TRIS-HCL	0,291	0,211	0,594	2,81	0,383
	0,283	0,201	0,558	2,78	0,357
	0,394	0,218	0,540	2,48	0,322

* Controle conjugado (conjugado adicionado na ausência de soro controle)

Controle Negativo (mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos)

Controle Positivo (amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T pela técnica de microlinfocitotoxicidade)

Embora o teste T de Student não tenha revelado diferenças estatisticamente significantes entre a adição ou não de Triton-X100, quer ao se analisarem os índices CP/CN, quer a diferença CP-CN, optou-se pela adição deste detergente ao tampão de lavagem, pois, em sua presença, foram observados os menores valores de DO.; tanto no controle do conjugado, como no controle negativo, facilitando a remoção do conjugado livre.

2.3- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR PARA SENSIBILIZAÇÃO DA MICROPLACA

Alguns autores têm relatado que a sensibilidade dos testes imunoenzimático em fase sólida é melhor quando se trabalha em condições de excesso de antígeno (Gripenberg & Kurki, 1986).

A presente pesquisa avaliou o efeito da concentração de linfócitos T nos valores das densidades ópticas obtidas frente a soros controles negativo e positivo.

Na tabela 04, estão representadas as densidades ópticas das triplicatas dos testes realizados em concentrações de linfócitos T que variaram de 5×10^5 a 5×10^3 por escavação.

Tabela-04

Densidades Ópticas Médias obtidas em diferentes concentrações de Linfócitos T em presença de Soro Controles Negativo e Positivo.

Controle*	Número de Linfócitos T por cavidade							
	5×10^5	2.5×10^5	1.25×10^5	5×10^4	5×10^3	2×10^3	1×10^3	5×10^2
	0,340	0,309	0,318	0,374	0,332	0,275	0,314	0,320
Negativo	0,320	0,331	0,334	0,382	0,356	0,276	0,317	0,328
	0,330	0,282	0,343	0,371	0,381	0,299	0,308	0,332
	0,490	0,480	0,565	0,634	0,634	0,480	0,449	0,428
Positivo	0,460	0,489	0,619	0,643	0,622	0,489	0,428	0,432
	0,518	0,450	0,583	0,647	0,638	0,449	0,432	0,436
CP/CN**	1,5	1,5	1,8	1,7	1,8	1,7	1,4	1,3
CP/(CN+2dp)	1,4	1,3	1,7	1,7	1,6	1,5	1,3	1,3

* Controle Negativo (mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos)
Controle Positivo (amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T pela técnica de microlinfocitotoxicidade)

** Índice CP/CN = média das triplicatas das D.O. obtidas em presença de soro controle positivo dividido pela média das D.O. obtidas em presença de soro controle negativo.

Índices CP/CN médios de 1,7 ou 1,8 foram observados na faixa que variou de $1,25 \times 10^5$ a 2×10^3 linfócitos por escavação. Aparentemente, concentrações maiores induzem maior número de ligações inespecíficas das imunoglobulinas séricas e/ou do conjugado, evidenciado pelo aumento das densidades ópticas obtidas em presença de controle negativo.

Ao contrário, com o emprego de concentrações de linfócitos menores que 2×10^3 , o teste tende a perder a sensibilidade, evidenciado pela diminuição das densidades ópticas obtidas em presença do soro controle positivo.

A análise de variância para dois fatores com repetição (triplicatas) só mostrou equivalência estatisticamente significativa entre o uso das concentrações 5×10^4 e 5×10^3 .

Devemos ressaltar que o teste de CELISA permitiu discriminar reações positivas e negativas em todas as concentrações avaliadas, pois, mesmo se empregando como valor de corte (cut off) a média das densidades ópticas observadas no controle negativo acrescida de 2 desvios-padrões, as médias das densidades ópticas observadas nos controles positivos foram, pelo menos, 1,3 vezes maiores $[CP/(CN+2dp)]$.

Optamos pelo uso da concentração de intermediária de 5×10^4 linfócitos por escavação, pois esta, além de apresentar bom poder discriminatório entre reações positivas e negativas, e de representar uma situação em que se evita excesso ou escassez de antígenos, foi, também, a preconizada por outros autores que utilizaram linfócitos em sistemas de ELISA de fase sólida (Morris et al, 1982; Effros et al., 1985; Schlosser, et al., 1991).

2.4- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO CONJUGADO E TEMPO DE REAÇÃO COM O SUBSTRATO INDICADOR

Em testes imunoenzimáticos, tem sido preconizado que a concentração do conjugado enzimático e o tempo de incubação com o substrato, indicador da fixação do anticorpo anti-imunoglobulina, podem ser variáveis e são, em geral, inversamente proporcionais. Isto é, caso haja a necessidade de o teste ser realizado em curto espaço de tempo, costuma-se utilizar maiores concentrações de conjugado; por outro lado, conjugados mais diluídos devem ser incubados por um período de tempo maior (Voller, 1988).

A tabela 5 mostra a média das densidades ópticas com controles positivo e negativo testado em triplicata, usando-se diluições de conjugado que variaram de 1:200 a 1:8000. As microplacas foram sensibilizada com 5×10^4 linfócitos T/cavidade. O tempo de incubação após adição de OPD (substrato) foi de 15 e 30 minutos, quando, então, a reação enzimática foi paralisada pela adição de 50 μ l de H_2SO_4 . Logo em seguida, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 490 nm.

TABELA-05

Densidades ópticas de acordo com a diluição do conjugado (anti-IgG humana ligada a peroxidase) e tempo de incubação, com adição do substrato (Orto-fenilenodiamina).

Incubação (minutos)	Controle*	Diluição do Conjugado							
		1/200	1/400	1/800	1/1600	1/2000	1/3200	1/4000	1/8000
15	Negativo	1,369	1,130	0,830	0,485	0,334	0,057	0,044	0,025
	Positivo	1,613	1,450	1,182	0,738	0,558	0,090	0,080	0,047
	CP/CN	1,2	1,3	1,4	1,5	1,7	1,6	1,8	1,9
30	Negativo	1,620	1,376	0,954	0,657	0,473	0,067	0,049	0,033
	Positivo	1,792	1,634	1,408	0,908	0,822	0,107	0,061	0,065
	CP/CN	1,1	1,2	1,5	1,4	1,9	1,6	1,2	2,0

* Controle Negativo (mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos)
Controle Positivo (amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T pela técnica de microlinfocitotoxicidade)
CP/CN média das densidades ópticas obtidas em presença de controle positivo dividido pela média das densidades ópticas obtidas em presença de controle negativo

Em todas as diluições do conjugado avaliadas, não houve diferença estatisticamente significativa (teste T de Student) entre as densidades ópticas avaliadas após 15 ou 30 minutos da adição da OPD; embora, com este último, as médias tenham sido ligeiramente maiores em ambos controles. Assim optou-se pelo tempo de 15 minutos, visando à diminuição do tempo total de procedimento, sem prejuízo da sensibilidade do teste.

Optou-se também, em utilizar o conjugado na diluição 1:2000, pois foi a maior diluição, onde se observaram as menores densidades ópticas, em presença do controle negativo e, ao mesmo tempo, as maiores densidades ópticas em presença do controle positivo. Nesta diluição, os índices CP/CN foram 1,7 e 1,9 respectivamente, com 15 e 30 minutos de incubação com o substrato.

2.5- AVALIAÇÃO DO TESTE - Determinação do valor limiar de positividade (“cut off”).

Possíveis variações inerentes à técnica têm grande importância no momento de determinação do valor do limiar da reação positiva / negativa (valor de corte – cut off). Variações como a presença de IgG séricas inespecífica com diferentes avidades para os linfócitos; bem como variações na presença de “receptores inespecíficos” para imunoglobulinas séricas nas suspensões linfocitárias.

Para o estudo destas variações, foram avaliadas, separadamente, amostras de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino, não transfundidos; portanto, teoricamente, não portadores de aloanticorpos. Estas amostras e sua mistura foram submetidas ao teste CELISA, sobre três diferentes suspensões de linfócitos T.

Na tabela-06, estão representadas a média da triplicata das densidades ópticas verificada para cada soro, bem como, as médias e desvios-padrões entre as 20 amostras, sua mistura e controle positivo para cada suspensão celular.

TABELA-06

Densidades ópticas médias obtidas no teste CELISA, de 20 diferentes soros humanos normais e sua mistura, frente a três diferentes suspensões de linfócitos T

Número da Amostra de Soro*	Suspensão de Linfócitos T		
	A	B	C
1	0,345	0,305	0,240
2	0,354	0,336	0,274
3	0,309	0,338	0,255
4	0,337	0,298	0,243
5	0,379	0,271	0,183
6	0,472	0,317	0,271
7	0,367	0,294	0,197
8	0,388	0,355	0,254
9	0,412	0,355	0,272
10	0,344	0,293	0,197
11	0,317	0,249	0,214
12	0,397	0,345	0,208
13	0,420	0,213	0,170
14	0,426	0,260	0,261
15	0,269	0,316	0,277
16	0,383	0,264	0,202
17	0,329	0,267	0,234
18	0,486	0,279	0,190
19	0,347	0,286	0,217
20	0,306	0,213	0,273
Média ± Desvio Padrão	0,369 ± 0,055	0,293 ± 0,042	0,232 ± 0,035
Mistura *	0,452 ± 0,015	0,322 ± 0,010	0,240 ± 0,020
Controle Positivo	0,770 ± 0,01	0,558 ± 0,015	0,460 ± 0,02

* Mistura (mistura dos 20 soros obtidos de indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos, avaliados separadamente)

Controle Positivo (amostra de soro de indivíduo renal crônico, com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T pela técnica de microlinfocitotoxicidade)

2.6- TRATAMENTO DO SORO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE CELISA

É conhecido o fato de que pacientes renais crônicos apresentam distúrbios de coagulação (Kincaid-Smith, 1972). Por isso, mesmo após a retração do coágulo e centrifugação da amostra coletada no momento de realização de um exame, restos de fibrina podem permanecer no soro a ser testado. (Keros et al., 1982). Estes restos de fibrina podem aderir ao plástico (poliestireno) da placa de ELISA durante a primeira fase de incubação do soro com as células. A fibrina aderida ao plástico pode se ligar, inespecificamente, com o conjugado, levando a sua fixação durante a segunda etapa da reação, que, uma vez resistindo aos processos de lavagem, induzirá resultados falso-positivos após a adição do substrato revelador (Keros, et al., 1982).

Assim, no presente trabalho se avaliaram dois métodos de tratamento dos soros de pacientes renais crônico para a remoção de restos de fibrinas: 1- Filtração em papel (tabela-07) e 2- Tratamento com trombina (0,02µl de trombina para 0,1 ml de soro, 37°C 15 minutos), seguido de centrifugação (tabela-08). As reações no método de CELISA foram comparadas com as obtidas nos métodos de microlinfocitotoxicidade clássica dependente de complemento (CDC) e/ou potencializada com a adição de antiglobulina humana (CDC-AGH), uma vez que este, além de ser mais sensível, também, faz uso de um segundo anticorpos como no método de CELISA. Visto que, no método CELISA, as amostras de soro são avaliadas diluídas ao meio, esta diluição também foi empregada nas provas de microlinfocitotoxicidade.

Como pode ser observado na tabela-07, com o uso de amostras de soro não filtradas no teste CELISA, foram obtidas 6 reações falso-positivas, entre 7 amostras não reagentes nos métodos de microlinfocitotoxicidade. A pré-filtração das amostras de soro em papel diminuiu esta falsa positividade mas não eliminou o problema, pois 2 amostras ainda mantiveram a falsa reatividade.

O tratamento das amostras de soro com trombina resultou mais eficiente na remoção de restos de fibrinas. Como pode ser observado na tabela-08, em todas as amostras não reagentes pelos métodos de microlinfocitotoxicidade, que apresentavam falsa positividade antes do tratamento, foram observadas médias das densidades ópticas inferiores ao limiar de reatividade (valor de corte), após o tratamento e, portanto, sendo, os testes, interpretados como negativos.

TABELA 07

Médias das Densidades Ópticas (D.O.) e Interpretação dos testes de CELISA, realizados frente a amostras de soros de pacientes renais crônicos, com e sem filtração prévia em papel filtro e comparação com os testes de microlinfocitotoxicidade, na pesquisa de aloanticorpos.

Amostras(**)	CELISA				Microlinfocitotoxicidade(*)	
	Soro pré-filtrado		Soro não filtrado		CDC	CDC-AGH
	D.O.	Interpretação	D.O.	Interpretação	Interpretação	Interpretação
1	0,189	Negativo	0,515	Negativo	Negativo	Negativo
2	0,227	Negativo	0,887	Positivo	Negativo	Negativo
3	0,220	Negativo	0,960	Positivo	Negativo	Negativo
4	0,235	Negativo	0,683	Positivo	Negativo	Negativo
5	0,321	Positivo	0,840	Positivo	Negativo	Negativo
6	0,367	Positivo	0,948	Positivo	Negativo	Negativo
7	0,330	Positivo	0,967	Positivo	Positivo	Positivo
8	0,249	Negativo	0,910	Positivo	Negativo	Negativo
Controle Positivo	0,484	Positivo	0,981	Positivo	Positivo	Positivo
Controle Negativo	0,216 ± 0,030		0,497 ± 0,010		Negativo	Negativo
Valor de Corte	0,276		0,517			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes, todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).
2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

TABELA-08

Médias das densidades ópticas (D.O.) e interpretação dos testes de CELISA realizados frente a amostras de soros de pacientes renais crônicos, com e sem tratamento prévio com trombina e comparação com os testes de microlinfocitotoxicidade, na pesquisa de aloanticorpos

Amostras(**)	CELISA				Microlinfocitotoxicidade(*)	
	Soro pré-tratado com trombina		Soro sem pré-tratamento		CDC	CDC-AGH
	D.O.	Interpretação	D.O.	Interpretação	Interpretação	Interpretação
1	0,231	Negativo	0,411	Positivo	Negativo	Negativo
2	0,239	Negativo	0,413	Positivo	Negativo	Negativo
3	0,181	Negativo	0,361	Positivo	Negativo	Negativo
4	0,280	Negativo	0,375	Positivo	Negativo	Negativo
5	0,294	Negativo	0,496	Positivo	Negativo	Negativo
6	0,271	Negativo	0,381	Positivo	Negativo	Negativo
7	0,234	Negativo	0,373	Positivo	Negativo	Negativo
Controle positivo	0,800	Positivo	1,032	Positivo	Positivo	Positivo
Controle negativo	0,284± 0,015		0,265 ± 0,005		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,314		0,275			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes, todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA :foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).
2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

2.7- AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DO TESTE CELISA REALIZADO EM PLACAS ARMAZENADAS A -20°C

Para a avaliação do efeito do tempo de armazenamento a -20°C na estabilidade antigênica das suspensões de linfócitos T adsorvidos em placas de ELISA, foram avaliadas as densidades ópticas obtidas com amostras de soros de pacientes renais crônicos pré-tratadas com trombina em placas recém-preparadas e armazenadas por 6 meses.

Nesta avaliação as placas foram montadas com suspensões de linfócitos T de doadores cadáveres obtidas por ocasião da prova cruzada realizada para seleção dos candidatos a receptores. Foram utilizadas as amostras de soros obtidas nesta ocasião, congeladas a -20°C para a repetição dos testes pelo método de CELISA, 6 meses depois.

Os resultados obtidos nas duas ocasiões com método de CELISA (tabela-09) foram comparados com os previamente obtidos pelos métodos de microlinfocitotoxicidade clássica e potencializado com antigamaglobulina humana.

A comparação das médias das triplicatas das densidades ópticas obtidas pelo método de CELISA nas duas ocasiões não mostrou diferença estatisticamente significativa (teste T Student). Além disto, houve reprodutibilidade na interpretação dos testes, aplicando-se o valor de corte para o limiar de positividade (média do controle negativo acrescido de 2 desvios-padrões). Devemos ressaltar que ocorreu reprodutibilidade também nos resultados discordantes entre os métodos de citotoxicidade e CELISA obtidos com a amostra número 2, indicando a boa reprodutibilidade do método CELISA e a estabilidade antigênica das placas armazenadas a -20°C.

TABELA 09

Média das densidades ópticas(D.O.) e interpretação dos testes CELISA realizados com intervalo de 6 meses e comparação com os testes de microlinfocitotoxicidade na pesquisa de aloanticorpos, em amostras de soros de pacientes renais crônicos

Amostras	Microlinfocitotoxicidade		CELISA			
	CDC	CDC-AGH	Primeiro Teste		Segundo Teste	
	Interpretação	Interpretação	D.O.	Interpretação	D.O.	Interpretação
1	Negativo	Negativo	0,181	Negativo	0,301	Negativo
2	Positivo	Positivo	0,325	Negativo	0,281	Negativo
3	Negativo	Negativo	0,231	Negativo	0,204	Negativo
4	Negativo	Negativo	0,333	Negativo	0,279	Negativo
5	Negativo	Negativo	0,496	Negativo	0,308	Negativo
6	Negativo	Negativo	0,470	Negativo	0,245	Negativo
7	Positivo	Positivo	0,612	Positivo	0,836	Positivo
Controle positivo	Positivo	Positivo	0,705	Positivo	0,624	Positivo
Controle negativo	Negativo	Negativo	0,454 ± 0,030		0.265 ± 0,030	
			Valor de corte = 0,514		Valor de corte = 0,325	

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes, todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).
2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

2.8 -REPRODUTIBILIDADE INTRAENSAIO

Para a avaliação da reprodutibilidade intraensaio, analisou-se a percentagem de variação da amplitude das triplicatas das densidades ópticas, obtidas em 15 ensaios realizados em presença de controlos negativo e positivos, e amostras de soro de pacientes, reagentes e não reagentes no teste de CELISA, frente a diferentes suspensões de linfócitos T, num total de 60 avaliações.

A percentagem de variação foi calculada utilizando-se, para cada triplicata, o maior valor da densidade óptica subtraído do menor valor, dividido pelo menor valor e multiplicado por 100. Os valores das densidades ópticas e a percentagem de variação de cada triplicata estão expressos na tabela-10 e a fórmula sumariada a seguir:

$$\text{Variação (\%)} = [(>D.O - <D.O) \div <D.O] \times 100 .$$

A análise das percentagens de variação das triplicatas mostrou uma boa reprodutibilidade intrateste. A média entre os 60 testes foi de 7,9%, sendo 1% o valor mínimo e 28% o valor máximo. Em apenas 7 casos, a variação entre as triplicas foi maior que 15%, todas elas observadas com as amostras de pacientes renais crônicos, sendo 6 entre as não reagentes.

Tabela-10

Densidades ópticas (D.O.) e percentagem de variação das triplicatas do teste CELISA observadas frente a controles negativo e positivo, e amostras de soros de pacientes renais crônicos reagentes e não reagentes a diferentes suspensões de linfócitos T.

Soros Controles*				Soros de Pacientes Renais Crônicos**			
Negativo		Positivo		Não Reagentes		Reagentes	
D.O.	Variação	D.O.	Variação	D.O.	Variação	D.O.	Variação
0,244	12%	0,505	2%	0,371	23%	0,859	13%
0,218		0,502		0,351		0,814	
0,219		0,495		0,302		0,760	
0,260	3%	0,668	1%	0,282	1%	0,737	15%
0,252		0,660		0,281		0,641	
0,256		0,665		0,280		0,640	
0,301	2%	0,599	2%	0,195	21%	0,638	5%
0,304		0,606		0,213		0,659	
0,308		0,608		0,176		0,670	
0,402	1%	0,799	2%	0,285	24%	0,829	10%
0,403		0,811		0,273		0,756	
0,406		0,802		0,229		0,759	
0,330	6%	0,700	3%	0,309	8%	0,663	21%
0,335		0,722		0,317		0,685	
0,351		0,716		0,294		0,565	
0,357	12%	0,650	2%	0,267	28%	0,601	12%
0,320		0,654		0,224		0,542	
0,332		0,665		0,283		0,608	
0,375	1%	0,712	5%	0,276	4%	0,405	8%
0,379		0,700		0,265		0,417	
0,380		0,734		0,273		0,439	
0,265	6%	0,500	15%	0,266	11%	0,829	10%
0,265		0,503		0,258		0,756	
0,250		0,576		0,233		0,759	
0,455	9%	0,902	1%	0,170	10%	0,663	3%
0,456		0,905		0,159		0,685	
0,498		0,897		0,155		0,665	
0,388	10%	0,702	1%	0,241	13%	0,598	2%
0,377		0,697		0,215		0,602	
0,354		0,700		0,243		0,608	
0,456	2%	0,801	2%	0,280	22%	0,421	6%
0,449		0,817		0,277		0,446	
0,450		0,800		0,230		0,445	
0,263	5%	0,592	5%	0,213	24%	0,591	13%
0,250		0,565		0,189		0,522	
0,258		0,590		0,172		0,548	
0,345	9%	0,697	1%	0,276	4%	0,505	5%
0,386		0,688		0,251		0,456	
0,377		0,694		0,241		0,452	
0,426	2%	0,655	5%	0,271	2%	0,751	2%
0,418		0,609		0,261		0,753	
0,427		0,603		0,247		0,734	
0,380	8%	0,700	3%	0,216	15%	0,522	1%
0,388		0,721		0,188		0,528	
0,409		0,708		0,202		0,528	

* Controle Negativo (mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos)

Controle Positivo (amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T pela técnica de microlinfocitotoxicidade clássico)

** As amostras de soro dos pacientes renais crônicos foram consideradas reagentes no teste CELISA, quando a média das triplicatas das densidades ópticas foram maiores que a média das triplicas do controle negativo acrescido de 2 desvios-padrões, obtidas em presença da mesma suspensão celular.

2.9- AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO MÉTODO CELISA COMPARADO AO MÉTODO DE MICROLINFOCITOTOXICIDADE NA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTILINFOCITÁRIO

Para avaliar a sensibilidade do método CELISA, foram utilizadas diluições seriadas (razão 1:2) de um soro com especificidades anti-HLA conhecidas, anti-HLA-A23 e anti-HLA-A24, definidas pelo método de citotoxicidade clássico e duas suspensões de linfócitos T, uma portando o antígeno HLA-A23 e outra HLA-A 24. Os resultados obtidos foram comparados aos obtidos pelo método de microlinfocitotoxicidade, potencializado pela antigamaglobulina humana (CDC-AGH). Na tabela-11, estão representadas as médias das densidades ópticas obtidas com método CELISA e a percentagem de lise com método de CDC-AGH, bem como a interpretação dos resultados em ambos os métodos.

TABELA 11

Avaliação da sensibilidade do método CELISA, em relação ao de citotoxicidade potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH), utilizando-se um soro anti-HLA23 +A24 sobre linfócitos HLA-23 ouHLA-A24.

Diluição do soro	Célula HLA - A24 positiva				Célula -HLA - A23 positiva			
	CDC-AGH		CELISA		CDC-AGH		CELISA	
	% Lise	interpretação	D.O.*	interpretação	% Lise	interpretação	D.O.*	interpretação
1/2	100	Positivo	0,358	Positivo	100	Positivo	0,322	Positivo
1/4	100	Positivo	0,377	Positivo	100	Positivo	0,323	Positivo
1/8	75	Positivo	0,376	Positivo	75	Positivo	0,271	Negativo
1/16	25	Negativo	0,271	Positivo	25	Negativo	0,227	Negativo
1/32	0	Negativo	0,184	Negativo	0	Negativo	0,177	Negativo
Controle positivo	100	Positivo	0,449	Positivo	100	Positivo	0,783	Positivo
Controle negativo	0	Negativo	0,199 ± 0,020		0	Negativo	0,253 ± 0,030	
Valor de corte			0,239				0,313	

Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de citotoxicidade clássica dependente de complemento.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios-padrões).
2- testes de CDC-AGH: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

Como podem ser observados, os títulos de reatividade do soro foram semelhante com ambos os métodos, embora tenha sido um diluição maior no método CDC-AGH, quando avaliada reatividade do soro em linfócitos HLA-A24 e uma diluição maior no método CELISA, quando avaliada em linfócitos HLA-A23.

2.10- AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE INTERENSAIO NA SENSIBILIDADE MÉTODO CELISA

A reprodutibilidade do teste foi verificada utilizando-se diluições seriadas de um soro contendo anticorpos anti-HLA-A9 em duas ocasiões diferentes, em uma mesma população de linfócitos T, portadores do antígeno HLA-A9, adsorvida em placas de ELISA e armazenadas a -20° C. Os resultados estão representados na tabela 12.

TABELA 12

Avaliação da reprodução da sensibilidade do método CELISA realizado em duas ocasiões diferentes, utilizando-se a mesma amostra de soro, contendo anticorpos anti-HLA A9 e suspensão linfocitária portadora do antígeno HLA-A9.

	Primeiro Teste		Segundo Teste	
Diluição do soro	D.O*.	Interpretação	D.O.	Interpretação
1/2	0,662	Positivo	0,521	Positivo
1/8	0,633	Positivo	0,474	Positivo
1/32	0,555	Positivo	0,494	Positivo
1/64	0,543	Positivo	0,472	Positivo
1/128	0,428	Positivo	0,308	Positivo
1/256	0,210	Negativo	0,200	Negativo
Controle positivo	0,769	Positivo	0,497	Positivo
Controle negativo	0,253 ± 0,015		0,226 ± 0,024	
Valor de corte	0,283		0,274	

Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de citotoxicidade clássica dependente de complemento.

Interpretação: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios-padrões).

O teste T de Student não revelou diferença estatisticamente significativa, entre as duas ocasiões do teste CELISA, no índice equivalente à divisão das médias das densidades ópticas obtidas com as diluições do soro, pela média das densidades ópticas obtidas em presença do controle negativo acrescido de dois desvios-padrões (valor de corte). Assim, a variação interteste foi considerável aceitável.

2.11- COMPARAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO MÉTODO CELISA COM O MÉTODO DE MICROLINFOCITOTOXICIDADE.

Nas tabelas 13 e 14, estão resumidas as concordâncias e discordâncias nas interpretações dos resultados das provas cruzadas empregando-se, concomitantemente, os métodos CELISA e CDC e CELISA e CDC-AGH. Utilizaram-se, ainda, amostras de soros provenientes de 10 gestantes normais no primeiro trimestre de gravidez e de 96 pacientes em hemodiálise crônica. Foram utilizadas as mesmas suspensões de linfócitos T, num total 226 comparações com o teste CELISA. Nos métodos CDC e CDC-AGH, empregaram-se linfócitos viáveis e, no método CELISA empregaram-se linfócitos desidratados e adsorvidos em placas de ELISA.

TABELA 13
Comparação das Provas Cruzadas realizadas pelos métodos de CELISA e Microlinfocitotoxicidade Dependente de Complemento (CDC)

Soro	CELISA+ / CDC+	CELISA- / CDC-	CELISA+ / CDC-	CELISA- / CDC+
Gestantes	18	76	32	4
Renal Crônico	7	70	18	1
Total	25 (11,1%)	146 (64,6%)	50 (22,1%)	5(2,2%)

Fonte anexos-02 e 03

TABELA 14
Comparação das Provas Cruzadas realizadas pelos métodos de CELISA e microlinfocitotoxicidade potencializado com antglobulina humana (CDC-AGH)

Soro	CELISA+ / CDC+	CELISA- / CDC-	CELISA+ / CDC-	CELISA- / CDC+
Gestantes	27	77	23	3
Renal Crônico	11	69	14	2
Total	38 (16,8%)	146 (64,6%)	37 (16,4%)	5(2,2%)

Fonte anexos-02 e 03

Nas 226 comparações (130 com soros de gestantes e 96 com soros de renais crônicos) entre os métodos CELISA e CDC, foram observadas 75,7% de reações concordantes. Em 22,1%, das comparações, a reação positiva foi observada apenas no método CELISA. Em apenas 2,2%, foram observadas reações positivas exclusivamente na CDC. Nestes, a positividade do soro do paciente renal crônico foi devida ao anticorpo citotóxico da classe IgM, avaliada pelo pré-tratamento do soro com detioteitrol (DTT).

A comparação da reatividade das mesmas amostras de soro nos métodos CELISA e CDC-AGH demonstrou 81,4% de reações concordantes. Em 16,4% das comparações, a reação positiva foi observada apenas no método CELISA. Em apenas 2,2%, foram observadas reações positivas exclusivamente na CDC.

As percentagens de reações positivas foram 13,3%; 19,0% e 33,2%, respectivamente, nos métodos CDC, CDC-AGH e CELISA (Anexo 02 e 03).

2.12 AVALIAÇÃO DO MÉTODO CELISA PARA DETERMINAÇÃO DA REATIVIDADE CONTRA PAINEL DE LINFÓCITOS E CARACTERIZAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS LOANTICORPOS

Para avaliar a adequação do método CELISA na determinação da Reatividade Contra Painel de Linfócitos (RCP) e caracterizar as especificidades anti-HLA dos aloanticorpos, avaliou-se a reação do soro de 7 pacientes com história de aborto espontâneo recorrente (AER), obtido após tratamento imunizante com linfócitos do esposo. Tanto as pacientes, como seus respectivos esposos foram previamente tipados para os antígenos HLA. Também foram estudadas amostras de soro obtidas de 8 pacientes Renais Crônicos (RC) politransfundidos.

As amostras de soro foram avaliadas pelos métodos CELISA, CDC e CDC-AGH, frente a um painel de linfócitos proveniente de 28 indivíduos tipados para os antígenos HLA-A e B.

Nos métodos CDC e CDC-AGH, foram utilizados linfócitos viáveis enquanto que, no método CELISA, empregaram-se linfócitos desidratados e adsorvidos em placas de ELISA, armazenados a -20°C. Os dados relativos aos soros das pacientes com AER e RC estão representados, respectivamente, nas tabelas 15 e 16.

Tabela-15

Caracterização das especificidades Anti-HLA, no soro de pacientes com história de Aborto Espontâneo Recorrente imunizadas com linfócitos do cônjuge. Resultados expressos pelo número de reações positivas, em relação ao número de células que portam o antígeno HLA correspondente à especificidade do anticorpo.

Caso Número	Métodos(*)	Especificidades Anti-HLA A e B			
		Privadas		CREG *	
12	CDC	A2		A(25,26,28)	
		2/7		1/13	
	CDC-AGH	5/7		4/13	
	CELISA	2/7		2/13	
14	CDC	B7	B53	B(27,13)	B(5,35,21,16)
		5/8	0/1	1/5	3/17
	CDC-AGH	8/8	1/1	3/5	7/17
	CELISA	6/8	1/1	4/5	9/17
15	CDC	A2	A3	A(28,10,30)	A(11)
		6/7	6/6	9/14	0/3
	CDC-AGH	7/7	6/6	11/14	3/3
	CELISA	7/7	6/6	13/14	1/3
26	CDC	A26	B18	A(1,3,23,24,30,31,32,33)	B(5,35,15,21,22)
		4/6	3/3	10/23	9/19
	CDC-AGH	6/6	3/3	20/23	13/19
	CELISA	6/6	3/3	12/23	15/19
29	CDC	A3	B7		
		0/6	0/8		
	CDC-AGH	4/6	3/8		
	CELISA	1/6	1/8		
46	CDC	A1	A11	A(23,3,2,28,30)	
		2/7	3/3	3/21	
	CDC-AGH	6/7	3/3	12/21	
	CELISA	6/7	2/3	13/21	
63	CDC	A2		A(28,1,9,10,w19)	
		2/7		4/26	
	CDC-AGH	4/7		15/26	
	CELISA	6/7		24/26	

(*) CELISA: método imunoenzimático celular . CDC: método de citotoxicidade clássica dependente de complemento. CDC-AGH: Método de citotoxicidade potencializado com antigamaglobulina humana.
CREG (Cross Reacting Group): grupo de antígenos com reação cruzada
P: tipagem da paciente
E: tipagem do esposo
Fonte: anexo 4

Tabela-16

Caracterização das especificidades Anti-HLA, no soro de pacientes renais crônicos politransfundidos. Resultados expressos pelo número de reações positivas, em relação ao número de células que portam o antígeno HLA correspondente à especificidade do anticorpo.

Caso Número	Métodos	Especificidades Anti-HLA A e B								Reações
1		A2	A28	A9	A10	Aw19	A3			Inexplicadas
	CDC	4/4	1/2	7/11	2/4	4/12	1/3			0
	CDC-AGH	4/4	2/2	10/11	4/4	12/12	3/3			0
	CELISA	3/4	1/2	7/11	2/4	8/12	2/3			0
2		A2	A28	A9	A10	Aw19				
	CDC	4/4	2/2	2/11	0/4	2/12				0
	CDC-AGH	4/4	2/2	8/11	3/4	6/12				0
	CELISA	1/4	0/2	1/11	1/4	3/12				0
3		A2	A28	A9	A10	Aw19				
	CDC	4/4	1/2	3/11	3/4	6/12				0
	CDC-AGH	4/4	2/2	8/11	4/4	8/12				0
	CELISA	2/4	2/2	4/11	0/4	6/12				0
4		A9	Aw19							
	CDC	9/11	0/12							0
	CDC-AGH	11/11	1/12							0
	CELISA	6/11	6/12							0
5		A11								
	CDC	6/7								0
	CDC-AGH	7/7								0
	CELISA	2/7								6
6		A9	Aw19	A10	A11					
	CDC	10/11	2/12	1/4	1/7					0
	CDC-AGH	11/11	6/12	3/4	4/7					0
	CELISA	8/11	6/12	3/4	5/7					0
7		B5	B17	B16	B49					
	CDC	3/5	2/4	1/2	3/3					2
	CDC-AGH	1/5	0/4	0/2	0/3					0
	CELISA	0/5	0/4	0/2	0/3					0
8		B5	B35	B18	B17	B53	B16	B13	B14	
	CDC	3/5	1/5	0/3	1/4	0/1	2/3	1/3	1/4	0
	CDC-AGH	3/5	5/5	2/3	3/4	1/1	2/3	3/3	4/5	2
	CELISA	3/5	5/5	3/3	4/4	1/1	3/3	2/3	4/5	1

(*) CELISA: método imunoenzimático celular . CDC: método de citotoxicidade clássica dependente de complemento. CDC-AGH: Método de citotoxicidade potencializado com antigamaglobulina humana.

CREG (Cross Reacting Group): grupo de antígenos com reação cruzada

Fonte: anexo 5

Entre as 7 pacientes com AER, apenas uma (número 29) desenvolveu anticorpos reagentes exclusivamente com células do painel que portavam os mesmos antígenos HLA expressos nas suspensões linfocitárias utilizadas para imunização terapêutica (HLA-A3 e B7). Todas as demais desenvolveram anticorpos com especificidades privadas e públicas, isto é, o soro além de reagir com as células portadoras dos mesmos antígenos presentes nas células do esposo, também reagiram com células do painel que portavam antígenos do grupo de reação cruzada (CREG). Como pode ser observado na tabela 15, os três métodos foram capazes de detectar tanto as especificidades privadas, como públicas, porém com diferentes graus de discriminação. Os métodos CDC, CDC-AGH e CELISA foram capazes de reagir, respectivamente, com 47,8%; 81,2% e 68,1% das células do painel portadoras dos antígenos correspondentes às especificidades privadas e com 29,1%; 62,4% e 66,0% das células portadoras de antígenos de reação cruzada. Em relação aos demais, o método CDC se mostrou menos sensível tanto para a detecção das especificidades privadas, como para as do grupo de CREG. Não houve diferença estatisticamente significativa na sensibilidade entre os métodos CDC-AGH e CELISA (teste Qui-quadrado).

Todos os pacientes renais crônicos incluídos neste estudo eram politransfundidos. Porém, como não eram conhecidas as tipagens HLA dos doadores de sangue, não foi possível separar as especificidades entre privada e pública. Todavia, devido ao fato de estes pacientes terem recebido transfusões de diferentes doadores é mais provável que tenham desenvolvido aloanticorpos para diferentes antígenos HLA, e que os mesmos também reajam com antígenos dos grupo de CREG. Como pode ser observado na tabela 16, entre os 8 pacientes, 1 (número 5) aparentemente desenvolveu aloanticorpo exclusivamente contra o antígeno HLA-A11, detectado, principalmente, pelos métodos de citotoxicidade. Neste caso, o método CELISA foi capaz de reagir apenas com 2 entre 7 células do painel portadoras do antígeno. Ao mesmo tempo, foram detectadas 6 reações, não explicadas nem mesmo como devidas a antígenos de reação cruzada. Em todos os demais pacientes, foi possível caracterizar pelo menos duas especificidades anti-HLA. Os métodos CDC, CDC-AGH e CELISA foram capazes de reagir, respectivamente, com 43,5%; 68,9% e 47,4% das células do painel portadoras dos antígenos correspondentes às especificidades. Ao contrário do observado entre as pacientes com AER imunizadas especificamente, entre os pacientes renais crônicos politransfundidos não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os métodos CDC e CELISA. Neste caso, o método CDC-AGH se mostrou superior a ambos (teste Qui-quadrado).

A distribuição dos pacientes com AER e RC, em diferentes faixas de RCP avaliada pelos 3 métodos, está representada na tabela-17.

Tabela-17

Distribuição (%) de pacientes com história de aborto espontâneo recorrente (AER), imunizadas com linfócitos do esposo e pacientes renais crônicos (RC) politransfundidos, de acordo com o nível de reatividade contra painel de linfócitos (RCP), empregando-se os métodos de citotoxicidade dependente de complemento (CDC), potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH) e imunoenzimático celular (CELISA).

RCP	0 %		0 – 20 %		20 - 50 %		≥ 50 %	
Pacientes	AER	RC	AER	RC	AER	RC	AER	RC
CDC	14,2	0	28,6	0	28,6	100	28,6	0
CDC-AGH	0	0	14,3	12,5	14,3	25,0	71,4	62,5
CELISA	0	12,5	28,6	12,5	0	37,5	71,4	37,5

Fonte: anexo 4e 5

A análise da distribuição (Qui-quadrado) dos 15 pacientes avaliados em conjunto não revelou diferença estatisticamente significativa, ao se compararem os métodos CDC e CELISA ou CDC-AGH e CELISA. Nos 3 métodos, foi observada maior frequência de pacientes nas faixas mais altas de RCP.

2.13 - RELEVÂNCIA DA PROVA CRUZADA PRÉ - TRANSPLANTE NA EVOLUÇÃO DO ENXERTO RENAL DE DOADOR CADÁVER, AVALIADA PELOS MÉTODOS CDC, CDC-AGH E CELISA.

Para avaliar a relevância clínica da prova cruzada utilizando-se o método de CELISA, foram realizados 18 testes, empregando-se a amostra de soro do paciente renal crônico, obtida por ocasião da prova cruzada e linfócitos do doador cadáver adsorvidos e armazenados em placas de ELISA. Somente os casos negativos, em ambos os métodos em que se fez uso da citotoxicidade, foram encaminhados para transplante e estão representados na tabela 18.

Tabela-18
Prova Cruzada Pré - Transplante e Evolução do Enxerto Renal de Doador Cadáver

Transplante Número	Prova Cruzada - Métodos (*)			Transplante		Observação (meses)
	CDC	CDC-AGH	CELISA	Evolução	Causa da Perda	
465	-	-	-	Boa		34
487	-	-	-	Boa		31
488	-	-	-	Boa		31
489	-	-	-	Boa		31
498	-	-	-	Boa		30
501	-	-	+	Boa		29
503	-	-	-	Boa		29
504	-	-	-	Boa		29
508	-	-	-	Boa		28
514	-	-	-	Boa		27
515	-	-	-	Boa		27
519	-	-	-	Boa		27
520	-	-	-	Boa		27
410	-	-	+	Perda	Não Imunológica	1
419	-	-	-	Perda	Não Imunológica	3º dia
483	-	-	-	Perda	Não Imunológica	20
509	-	-	+	Perda	Imunológica	3
482	-	-	-	Perda	Imunológica	19

(*) CDC: método de citotoxicidade clássica dependente de complemento. CDC-AGH: Método de citotoxicidade potencializado com antagaglobulina humana. CELISA: método imunoenzimático celular

Em apenas 3 casos, foi observada prova cruzada positiva com método CELISA. Destes, 2 (66,6%) perderam o enxerto em menos de 3 meses pós transplante. Em um, (número 410), a não função primária do enxerto, provavelmente, devida à má perfusão do rim no período pós-transplante. Já no transplante número 509, a perda foi devida à glomerulonefrite membranoproliferativa, provavelmente com associação imunológica. O terceiro paciente (número 501) vem apresentando boa função renal.

Entre os 15 demais pacientes, com prova negativa em todos os testes, apenas 3 (20,0%) perderam o enxerto. Em um (número 483), a perda foi devida à não aderência do paciente à terapia imunossupressora e em outro (número 419), a perda foi devida à trombose arterial ocorrida logo no terceiro dia pós transplante. Já no caso do transplante número 482, foi diagnosticada rejeição crônica, com associação imunológica e perda do rim em 19 meses pós transplante.

2.14 RELEVÂNCIA CLÍNICA DA REATIVIDADE CONTRA PAINEL DE LINFÓCITOS NA EVOLUÇÃO DO ENXERTO RENAL, AVALIADA PELOS MÉTODOS CDC, CDC-AGH E CELISA.

Considerando-se a importância do nível de reatividade contra painel de linfócitos (RCP) na sobrevida do enxerto renal e, por outro lado, as limitações dos métodos que fazem uso da citotoxicidade, na avaliação da RCP em amostra de soro obtidas no momento da prova cruzada, compararam-se os resultados da amostra pré-transplante, obtidos pelo método CELISA, CDC e CDC-AGH e sua importância clínica na evolução do transplante. Foram também incluídos no estudo a reatividade da amostra de soro mais reativa do paciente, denominada de histórica, definida pelo método CDC. Os resultados estão expressos na tabela-19.

Tabela 19

Reatividade Contra Pâncreas de linfócitos e Evolução do Transplante Renal

Transplante	Tipo	RCP ²	RCP Pré-Transplante			Transplante			
	de	histórico				Episódios			T.O ⁶
Número	Doador ¹	CDC ³	CDC	CDC-AGH ⁴	CELISA ⁵	Rejeição	Evolução	Causa da perda	Meses
326	HLA-II	3%	0%	0%	0%	0	Boa		58
339	HLA-III	0%	0%	0%	0%	2	Boa		57
356	HLA-III	13%	7%	17%	0%	0	Boa		54
343	HLA-III	7%	0%	0%	0%	0	Boa		56
289	HLA-II	7%	0%	0%	0%	1	Boa		63
348	HLA-II	10%	0%	0%	0%	2	Boa		58
379	HLA-II	7%	0%	0%	0%	0	Boa		51
376	HLA-III	7%	0%	0%	0%	0	Boa		51
408	HLA-II	0%	0%	0%	0%	0	Boa		46
295	HLA-III	7%	0%	0%	0%	4	Perda	Rejeição Crônica	11
305	HLA-III	0%	0%	0%	0%	7	Perda	Rejeição Crônica	16
290	HLA-III	10%	0%	0%	0%	3	Perda	Rejeição Crônica	11
321	HLA-II	13%	0%	0%	0%	4	Perda	Rejeição Crônica	31
308	HLA-III	3%	0%	0%	0%	2	Perda	Rejeição Crônica	34
362	HLA-III	60%	57%	82%	0%	5	Perda	Rejeição Crônica	30
346	HLA-III	0%	0%	0%	0%	1	Perda	Rejeição Crônica	>24
293	HLA-III	17%	28%	32%	0%	6	Perda	Rejeição Crônica	> 12
357	HLA-III	13%	0%	0%	0%	2	Perda	Rejeição Crônica	24
401	HLA-III	0%	0%	0%	0%	2	Perda	Rejeição Crônica	18
313	HLA-III	0%	0%	0%	0%	1	Perda	Rejeição vascular aguda	1
384	HLA-III	3%	0%	0%	0%	1	Perda	Não imunológica	24
331	HLA-III	0%	0%	0%	0%	1	Perda	Não imunológica	16

1- Tipo de Doador: HLA III (doador cadáver); HLA II (doador aparentado haplo-idêntico)

2- RCP: reatividade contra pâncreas de linfócitos (%)

3- CDC: citotoxicidade dependente de complemento

4- CDC-AGH: citotoxicidade potencializada com antígeno globulina humana

5- CELISA: método imunoenzimático celular

6- T.O.: tempo de observação (meses)

Em nenhum dos 22 casos estudados, foi observado qualquer nível de RCP pelo método CELISA na amostra de soro pré-transplante. Em 3 casos (13,6%), foram observadas reações positivas nos métodos CDC e CDC-AGH, sendo o nível de RCP mais alto neste último. Dois destes perderam o enxerto devido à rejeição crônica associada à natureza imunológica. Destaca-se que o paciente número 362 já tinha história de alta reatividade e o paciente número 293 era retransplantado e, mesmo assim o método CELISA não foi capaz de detectar a presença de aloanticorpos em duas ocasiões diferentes em que os testes foram realizados. O paciente número 356 vem apresentando boa função renal, sem nenhum episódio de rejeição até o presente momento.

DISCUSSÃO

Escolha e Sensibilização de Placas de Poliestireno com Suspensões Antigênicas Utilizadas no Teste CELISA

Os testes imunoenzimáticos de fase sólida exigem a sensibilização das placas de ELISA com a suspensão antigênica ou com anticorpos específicos. Estas placas podem ser confeccionadas com diversos tipos de plástico, tais como: poliestireno, polivinil clorido-PVC e polipropileno, (Clark & Engvall, 1988), sendo o último, o material mais usado (Carlier et al., 1981). As placas podem sofrer diferentes tratamentos no momento de sua confecção. O grau de adsorção inespecífica e, ao mesmo tempo, a capacidade de retenção do antígeno ou anticorpo variam segundo a natureza do plástico e os processos de produção das placas (Carroll et al., 1990; Lutz et al., 1990; Ravindranath et al. 1993).

Em casos como o padronizado neste trabalho onde a suspensão antigênica é constituída de células, podem ser utilizados diferentes processos para a sensibilização da superfície plástica. O uso de fixadores como glutaraldeído (GA) e poli-L-Lisina (PLL) é muito discutido na literatura. Alguns autores citam efeitos adversos, gerando resultados falso-positivos ou falso-negativos devido à destruição ou modificação dos antígenos celulares (Drover & Marshall, 1986; Posner et al., 1982), em particular dos antígenos HLA (Lieber, 1982), enquanto outros não observam estes efeitos usando GA, desde que se respeitem concentrações entre 0,5% a 0,025%. (Cobbold & Waldmann, 1981; Carroll et al., 1990). Assim, optou-se, com sucesso, pelo uso da adsorção passiva dos linfócitos T à superfície do plástico, como proposto por Cantarero e colaboradores (1980), utilizando proteínas solúveis. Este método foi utilizado por outros autores, trabalhando com antígenos em células íntegras, tais como antígenos ABO (Arunachalam et al., 1990), ou antígenos tumorais de células pancreáticas de rato (Schlosser et al., 1991).

Classicamente, o uso de tampão Carbonato-bicarbonato pH 9,6 tem sido recomendado no preparo da solução de sensibilização. Entretanto, estudos de comparações de diferentes tampões indicaram que o tampão PBS pH 7,2 pode ser usado com resultados similares (Carlier & Capron, 1981). Kuen e colaboradores (1993) relataram a menor incidência de reações inespecíficas, utilizando tampão PBS, pH 7,2, em ensaios imunoenzimáticos para a pesquisa de anticorpos anti-insulina. Lutz e colaboradores (1990) observaram que o uso deste tampão facilita a adsorção de proteínas solúveis obtidas a partir de membrana de eritrócitos, pois a atividade d'água é reduzida pelo sal do tampão e a proteína antigênica fica mais próxima da superfície plástica.

Embora seja possível a adesão passiva dos linfócitos T à superfície da placa de ELISA, é preciso levar em consideração a natureza do plástico utilizado, seu grau de porosidade e a carga elétrica das regiões descobertas. Estes fatores podem levar à ligação inespecífica de proteínas séricas ou anticorpos conjugados a enzima, respectivamente,

utilizados durante a primeira e a segunda fase do teste imunoenzimático.

Alguns autores têm preconizado que estes fatores podem ser minimizados pelo uso associado de proteínas não reativas e detergentes não iônicos que, respectivamente, ocupariam poros livres da superfície plástica, e preveniriam a formação de novas interações hidrofóbicas entre as proteínas séricas (e reagentes) posteriormente adicionados, sem romper as pontes hidrofóbicas já formadas previamente entre as células e o plástico (Clark & Engvall, 1988; Craig, et al., 1993; Avrameas, 1992).

Ao se compararem as 3 placas utilizadas neste trabalho (Costar®, Immunolon-1® e Nunc®), sem a adição da suspensão celular, ficou evidente a superioridade da marca Nunc®. Considerando-se que não foram adicionados à placa nem o antígeno, nem o anticorpo específico, não se esperaria a presença de reação cromogênica. Esta marca foi a que apresentou menor adsorção inespecífica de proteínas do soro controle negativo e dos demais reagentes, revelada pela baixa densidade óptica obtida em relação às outras duas placas. Uma vez que todas as placas eram de poliestireno, a diferença, provavelmente, se deva ao processo industrial utilizado para a sua confecção.

Ravindranath e colaboradores (1994) relataram que a eficiência no bloqueio da adsorção inespecífica à superfície plástica varia conforme a marca da placa de ELISA e o tipo de solução bloqueadora utilizada. Todavia, as diferenças entre as marcas das placas, utilizadas no presente trabalho, tenderam a desaparecer quando estas foram previamente adsorvidas com a suspensão de linfócitos T, e as variações nas absorbâncias inespecíficas passaram a ser dependentes do tipo de solução bloqueadora utilizada. Com isto foi possível realizar os testes com as placas Costar®, em disponibilidade no laboratório.

Mesmo com a adição da suspensão antigênica, sempre foi observado algum grau de absorção óptica em todas as situações em que o teste foi realizado em presença de soro controle negativo, independentemente da solução bloqueadora. Isto pode ser devido à presença ligações inespecíficas a receptores para fração Fc das imunoglobulinas, nos linfócitos T ativados (ou em outras células contaminantes), que não conseguiram ser totalmente bloqueados, mesmo com o uso de soro de coelho, agora adicionado à solução bloqueadora, na concentração de 1%, com o objetivo de bloquear os sítios Fc livres. Arunachalam e colaboradores (1990) obtiveram resultados semelhantes, fazendo uso de soro de coelho com os mesmos propósitos.

Outro fator a ser levado em conta, seria a presença de células B ativadas, que possuem, constitutivamente, IgG na sua superfície e podem ter sido, acidentalmente, liberadas da fibra de nylon no momento da separação das populações celulares. Sua presença levaria à ligação inespecífica do conjugado, constituído de antigamaglobulina humana. Como esta adsorção inespecífica é um fator da suspensão antigênica, ela também deve ocorrer quando o teste é realizado em presença de soro contendo aloanticorpos

específicos para antígenos da suspensão celular. Este fator é normalmente descontado no cálculo do limiar de reatividade, considerado para cada suspensão celular, tendo como parâmetro as reações obtidas em presença do soro controle negativo.

Proteínas séricas ou do conjugado enzimático podem ainda aderir diretamente à superfície plástica que restou descoberta após a adição da suspensão antigênica. Em nosso trabalho, as menores densidades ópticas em presença de soro controle negativo foram observadas quando, além da adição de soro de coelho, também se fez uso de leite em pó desnatado e de detergente Triton X-100 na solução bloqueadora.

A eficiência do leite em pó se deve, provavelmente à caseína, que, na realidade representa uma mistura de proteínas de diferentes seqüências de aminoácidos, grau de glicosilação, sulfatação e ponto isoeletrico, aliado ao fato de a maioria ser de baixo peso molecular (Taborsky, 1974). Como nem todos os bloqueadores agem igualmente, o tamanho da proteína usada para bloqueio pode influenciar, permitindo que proteínas pequenas sejam mais eficientes que as grandes (Kemeny, 1992). Assim, a caseína teria maior capacidade de produzir o bloqueio de diferentes sítios, pelas diferentes propriedades químicas. Outros autores têm demonstrado a superioridade do uso do leite em pó em relação a outras proteínas, como gelatina ou soro bovino fetal, como constituinte de tampões bloqueadores utilizados em testes imunoenzimáticos (Kenna et al., 1985; Pratt & Roser, 1989).

Analisando as diferentes soluções bloqueadoras, ficou clara a necessidade da adição do detergente não iônico Triton-X-100, na concentração de 0,1% ou 0,2 %. Na sua ausência ou na concentração de 0,05%, o poder discriminatório entre reação positiva e negativa foi menor, observado pelos valores dos índices CP/CN. Aparentemente, as concentrações de 0,1% e 0,2 % do detergente permitiu um bloqueio eficiente das ligações inespecíficas, quando associado ao leite em pó desnatado.

A escolha do detergente foi baseada na propriedade característica dos detergentes não iônicos, de não induzirem desnaturação protéica, permitindo estabilidade antigênica, e indicado para uso em ensaios imunoenzimáticos (Helenius et al., 1979; Gardas & Lewartwska 1988; Neugebauer, 1990; Craig et al., 1993). Dimitriadis (1979) também concluiu que a concentração de 0,1% de Triton-X-100 era mais indicada para revelar interações antígeno-anticorpo em ensaios, empregando-se imunoprecipitação, em solução ou em imunodifusão, em gel de ágar.

Considerando-se o poder discriminatório entre reações positivas e negativas, aliadas às propriedades de bloqueio de sítios livres da superfície plástica (feita pelo leite em pó e detergente não iônico, juntamente com o bloqueio de receptores celulares para porção Fc da IgG humana, por anticorpos de coelho, que não poderão ser detectados pelo conjugado enzimático constituído de antigamaglobulina humana marcada), optou-se pela solução bloqueadora constituída por: tampão TRIS-HCl acrescida de 0,1% de Triton-x-100, 1,0% de

soro de coelho inativado, e 3,0 % de leite em pó desnatado.

Uma vez recoberto todos os sítios inespecíficos pela solução bloqueadora, utilizou-se como solução de lavagem, tampão TRIS-HCl 10mM, pH 7,6, acrescido de apenas 0,05% de detergente Triton-x-100, para facilitar a retirada do conjugado livre na reação.

O Tampão TRIS-HCl pH 7,6 na concentração de 10mM, foi escolhido para a elaboração das soluções de lavagem e bloqueadoras, tendo como base trabalhos que demonstraram que seu uso reduzia o número de ligação inespecífica, em testes imunoenzimáticos. Estes estudos relataram a concentração de 10mM como a mais apropriada, pois evitava a formação de alta força iônica e, conseqüentemente, decréscimo da atividade enzimática. Além disto, a sensibilidade do teste era ainda favorecida devido ao fato de todas as reações do teste ocorrerem em pH próximo ao fisiológico (Kenna et al., 1985; Stoll & Blanchard, 1990; Kemeny 1992).

Determinação da Concentração Celular

Observou-se neste trabalho, bom poder discriminatório entre os testes CELISA realizados em presença de soro controle negativo e positivo em concentrações que variaram de $1,25 \times 10^5$ a 2×10^3 linfócitos T por escavação. Variação semelhante foi encontrada por Arunachalam, 1990, o qual cita como ideal a faixa entre 16×10^4 a 2×10^3 células por cavidade da microplaca.

Embora alguns autores relatem que a sensibilidade dos testes imunoenzimáticos em fase sólida é melhor quando se trabalha em condições de excesso de antígeno (Gripenberg & Kurki, 1986), este fato não se confirmou no presente trabalho, onde se constatou diminuição no nível das densidades ópticas, em presença de soro controle positivo. Provavelmente, esta menor reatividade ocorreu devido ao fato de que altas concentrações de antígeno podem levar a um decréscimo na ligação de anticorpos, devido ao empacotamento das células por falta de espaço na superfície do plástico (Kemeny, 1992), com possível alteração conformacional do antígeno, inibindo as ligações bivalentes dos anticorpos, (Pesce & Michael, 1992; Underwood; 1993), e favorecendo, ainda, a dissociação destas proteínas supostamente ligadas, durante o ensaio (Kemeny, 1992). Adicionalmente, devemos considerar que os antígenos de superfície celular podem se difundir lateralmente, alterando sua densidade (Larson, 1989). Isto poderia levar a uma modificação no padrão da reação.

Em concentrações inferiores a 5×10^3 células por escavação observamos uma diminuição no nível das densidade ópticas, em presença de soro controle positivo. Baixas concentrações celulares podem diminuir muito a sensibilidade em uma reação de CELISA, pois em situações onde ocorre a ligação do anticorpo a um antígeno de fase sólida, a avidade é diretamente proporcional à concentração do antígeno (Kaufman & Jain, 1992). Mesmo na presença de altas concentrações de anticorpo, com a baixa concentração antigênica, a placa

ficaria saturada com poucas unidades de anticorpos fixados, pois, com os processos de lavagens, os aloanticorpos com baixa avidade se dissociariam facilmente. Com isto, na segunda incubação com o conjugado, pode não restar aloanticorpo suficiente para revelar uma reação cromogênica (Underwood, 1993).

Em vista do descrito, escolheu-se o uso da concentração intermediária de 5×10^4 células/escavação (50 μ l de 1×10^6 linfócitos/ml, em PBS) pois, esta além de apresentar bom poder discriminatório entre reações positivas e negativas, também representa uma situação em que se evita excesso ou escassez de antígenos. Esta concentração também foi indicada como sendo a mais adequada por outros autores que trabalharam com sistemas de ELISA, empregando-se antígenos celulares (Morris et al., 1982; Effros et al., 1985; Schlosser et al., 1991).

Titulação do Conjugado e Tempo de Reação

Embora em ensaios enzimáticos não competitivos seja aconselhado o uso de conjugado em excesso (Kemeny, 1992), ao se avaliarem diferentes diluições utilizando soros controles positivo e negativo, verificou-se que, em diluições muito baixas, ocorria uma remoção incompleta, pelas lavagens do conjugado não ligado ao anticorpo, ou adsorvido inespecificamente. O mesmo foi verificado por Morris e colaboradores (1982).

Por outro lado, diluições muito altas diminuía a sensibilidade do teste; sendo, então, adequada a diluição de 1/2000, em tampão TRIS-BSA, na qual obtivemos maior diferença de densidade óptica entre os soros controles positivos e negativos. Verificou-se ainda, que um aumento no tempo de incubação do conjugado de 15 para 30 minutos não resultou em aumento de sensibilidade, sendo então o tempo de 15 minutos mantido para a realização do teste.

Avaliação do Teste

Por mais que se procure controlar a fixação inespecífica do anti-anticorpo marcado com a enzima, algum nível de reação cromogênica sempre ocorre após a adição do substrato revelador da sua fixação, mesmo na ausência dos aloanticorpos pesquisados. Assim, para a correta interpretação dos testes imunoenzimáticos, há a necessidade de se estabelecer um valor mínimo, a partir do qual as densidades ópticas observadas possam ser consideradas como reatividade específica.

Este valor de corte ("cut off") é estabelecido, tendo como base as reações obtidas frente ao soro controle negativo. Entretanto, variações individuais entre diferentes amostras de soro controle negativo também podem ocorrer, devido à presença de anticorpos contra componentes da solução bloqueadora, como proteínas do leite em pó (Harris et al. 1989) e soro de coelho (Craig et al., 1993). Além disto, é preciso também se ter em mente que as

suspensões celulares podem variar quanto à presença de receptores inespecíficos, principalmente para a porção Fc, para as imunoglobulinas séricas ou conjugadas à enzima (Morris, 1982; Arunachalam, 1990).

A avaliação de 20 diferentes soros normais e sua mistura em suspensões celulares de 3 diferentes indivíduos não mostrou diferenças estatisticamente significantes no nível de densidade óptica entre os soros. Entretanto, ela foi significativa entre as suspensões celulares. Assim, por uma questão de homogeneidade dos testes, esta pesquisa optou pelo uso de mistura de soros como controle negativo, como recomendado por outros autores (Kao et al., 1993), e estabeleceu como valor de corte da reação, a absorbância resultante desta mistura de soro negativo, acrescido de dois desvios-padrões.

Como foram observadas variações importantes conforme a suspensão celular utilizada, foi necessário que a reação com o soro controle negativo fosse realizada com cada tipo de célula utilizada. Assim, o valor de corte seria individual para cada suspensão celular.

Pré-Tratamento do Soro de Pacientes para Pesquisa de Aloanticorpos pelo Método CELISA

Numerosos estudos têm sido feitos no intuito de elucidar a natureza das desordens de hemostasia associadas a doença renal (Kincaid-Smith, 1972; George et al., 1974). Devido à dificuldade na retração do coágulo, e ação plaquetária deficiente, o soro destes pacientes costuma apresentar restos de fibrina, os quais podem aderir ao plástico (poliestireno) durante a primeira incubação do soro do paciente com as suspensões celulares. Tal aderência pode provocar a ligação inespecífica do anticorpo conjugado à enzima, durante a segunda fase de incubação, levando a resultados falso-positivos no momento da adição do substrato. (Keros et al., 1982).

Apesar do congelamento e descongelamento das amostras de soro e da simples filtração em papel Whatman 42 ter diminuído, a incidência de reações falso-positivas no teste CELISA, quando comparado ao teste de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) ou potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH), 2 entre seis 6 amostras ainda mantiveram este padrão de reação. Assim, resolveu-se fazer o tratamento com trombina de todas as amostras de soro e controles, seguida de centrifugação, imediatamente antes da realização do teste CELISA, abolindo a interferência causada por restos de fibrina. O pré-tratamento de amostras de soro com trombina também tem sido empregado com eficácia por outros autores, trabalhando com ensaios imunoenzimáticos na pesquisa de marcadores sorológicos para hepatite B (Keros et al., 1982).

Estabilidade da Suspensão Antigênica e Reprodutibilidade Inter e Intraensaio

A possibilidade de armazenamento de placas de ELISA contendo suspensões de linfócitos T de diferentes indivíduos, portando diferentes especificidades HLA, seria de grande utilidade na rotina laboratorial para a pesquisa de aloanticorpos no soro de pacientes politransfundidos, bem como na definição das especificidades anti-HLA. Principalmente, se se levar em conta que o CELISA é um teste que independe da viabilidade celular, de fácil execução, parcialmente automatizado e realizado num curto período de tempo, quando comparado ao teste de citotoxicidade dependente de complemento, utilizado para definir a reatividade do soro contra painel de linfócitos. Para tanto, é necessário que a suspensão antigênica permaneça estável mesmo após prolongado armazenamento.

A comparação dos resultados obtidos na titulação de amostra de soro frente a uma mesma célula, em intervalos de 6 meses, mostrou a reprodutibilidade dos testes CELISA, realizados em placas recém-preparadas e armazenadas a -20°C. Neste interensaio, a variação de apenas um título foi considerada satisfatória. Trabalhos que também fizeram uso de suspensões celulares relataram boa estabilidade antigênica em placas armazenadas a -20°C por 6 meses (Arunachalam et al., 1990), ou por mais de doze meses a -80°C (Walker, et al., 1992).

O estudo da reprodutibilidade intraensaio também mostrou boa equivalência das triplicatas, pois, entre 60 testes, incluindo soros controles positivos e negativos e amostra de pacientes reagentes e não reagentes, foram encontrados apenas 7 testes em que a variação entre as triplicatas foi maior que 15%, resultado considerado aceitável de acordo com outros autores (Voller, 1988; Kao et al., 1993; Bryan et al., 1995).

Comparação da Sensibilidade entre os Testes CELISA e Microlinfocitotoxicidade

Uma vez que os testes imunoenzimáticos fazem uso de um segundo anticorpo, que teoricamente tem o poder de aumentar a sensibilidade da reação, resolveu-se incluir, no presente trabalho, a comparação do teste CELISA com o de microlinfocitotoxicidade potencializado com a adição de antigamaglobulina humana (CDC-AGH), que, apesar de mais trabalhoso que o método clássico, é considerado mais sensível por também fazer uso de um segundo anticorpo.

Os resultados revelaram sensibilidades equivalentes entre os dois métodos, na determinação do título de reatividade de um soro específico sobre duas diferentes suspensões celulares. A variação de apenas um título a mais em um ou outro método pode ser considerada desprezível, principalmente se se considerar em consideração que o método CDC-AGH depende da viabilidade celular, da concentração do complemento e toxicidade de anticorpos heterófilos no soro de coelho e da presença, no soro teste, de anticorpos capazes de fixar o complemento e ativar a reação em cascata, ou mesmo, de fatores anti-

complementares ou bloqueadores, comuns em soro de pacientes renais crônicos politransfundidos (Lieber, 1982; Lieber et al. 1992^b).

Recentemente, comparações entre painéis de reatividade realizados pela técnicas CDC-AGH e imunoenzimáticas para detecção anticorpos anti-HLA, utilizando antígenos solúveis HLA classe I, mostraram variações semelhantes (Bryan et al. 1995).

Comparação da Especificidade do Método CELISA em Relação aos Métodos de Citotoxicidade na Detecção de Aloanticorpos

O método CELISA empregado, nas provas cruzadas entre linfócitos de indivíduos normais e soros de gestantes e renais crônicos, revelou concordância de 75,7% e 81,4% respectivamente, entre os métodos CDC e CDC-AGH.

Recentemente, Buelow e colaboradores (1995^a) propuseram um novo processo para a pesquisa de aloanticorpos anti-HLA, utilizando-se o método imunoenzimático realizado em placas de ELISA adsorvidas com painel de antígenos HLA solúvel classe I, conhecido como PRA-STATTM (Baxter - SangStat Medical Corporation). Os referidos autores encontraram 92,4% de reações concordantes entre os métodos CDC-AGH e PRA-STAT.

Bryan e colaboradores (1995) compararam as reações obtidas com o painel PRA-STAT comercial e com o método CDC-AGH em painel de células com antígenos caracterizados. Neste trabalho, foi observado apenas 56% de reações concordantes na definição das especificidades. Avaliando a RCP no soro de pacientes renais crônicos não foi encontrada correlação entre os dois métodos ($r = 0,42$). A maior incidência de reações concordantes, aqui obtidas pode ser devida ao fato de o método imunoenzimático ter sido realizado em suspensões linfocitárias e não em antígenos solúveis.

Em nossos experimentos, um maior número de reações positivas foi observada com o método CELISA. Em 22,1 % e 16,4% das comparações, respectivamente, em relação aos métodos CDC e CDC-AGH foi observada reação positiva apenas com o método CELISA. A maior reatividade em relação ao teste CDC poderia ser explicada devido à presença de aloanticorpos da classe IgG em baixo título, ou a subclasses de IgG não fixadoras de complemento (IgG2 e IgG4) que dificultaria a citotoxicidade. Estes fatores não explicariam a maior reatividade em relação ao método CDC-AGH, uma vez que este também faz uso de um segundo anticorpo. Provavelmente, o método CELISA estaria detectando anticorpos contra antígenos de superfície não-HLA, encontrados, principalmente, no soro de gestantes (Innes et al, 1989).

Em 2,2% das comparações, foram observadas reações positivas nos métodos CDC e CDC-AGH e negativas no CELISA. Neste caso, o soro poderia estar apresentando, adicionalmente, anticorpos da classe IgM, com alta avidade, que não se desprenderiam com os subseqüentes processos de lavagem; ou então que estariam bloqueando, por competição,

a fixação de anticorpos IgG com a mesma especificidade. Os anticorpos IgM uma vez fixados ao linfócitos desencadeariam a ativação da cascata do complemento, levando à lise celular. Como no teste CELISA, o conjugado revelador dos aloanticorpos fixados era específico para IgG, os anticorpos IgM não teriam como ser detectados. Zachary e colaboradores (1995) demonstraram a capacidade de bloqueio da fixação de IgG a antígenos HLA solúveis, em testes imunoenzimáticos, por soros contendo anticorpos da classe IgM com a mesma especificidade.

Adicionalmente, os testes CDC-AGH e CELISA empregam suspensões celulares em diferentes estados de conservação. No método CDC-AGH, foram empregadas células viáveis que poderiam estar sintetizando e, conseqüentemente, expressando uma maior densidade de antígenos na membrana, em relação às células desidratadas, adsorvidas em placa de ELISA; fato este que, por si só, já mascararia os antígenos voltados para a superfície plástica.

Quando epítomos antigênicos estão presente em alta densidade, os teste de ELISA podem detectar anticorpos em níveis menores 1 ng / ml, independentemente da avidade do anticorpo. Quando os anticorpos são de baixa afinidade, este nível sobe para, pelo menos, 2 µg / ml (Steward & Lew, 1985).

Devemos também levar em consideração os procedimentos de lavagens para retirada do aloanticorpos não fixados à superfície dos linfócitos. No método CELISA, eles são mais intensos e vigorosos que os realizados no método CDC-AGH. Estes procedimentos poderiam contribuir para a retirada dos anticorpos fixados especificamente, porém com baixa avidade, o que explicaria a reação negativa, exclusivamente, no método CELISA..

É conhecido o fato que anticorpos produzidos na resposta primária possuem baixa avidade, que tende a aumentar com o tempo de exposição aos imunógenos (Eisen & Siskind, 1964). Em vacinação para rubéola, foi demonstrado por Hedman et al. (1989) que a avidez de anticorpos IgG nos primeiros dois meses após a vacinação era baixo, crescendo durante os quatro meses seguintes.

Assim, em algumas situações, falha de reatividade no teste CELISA poderia ser explicada se considerarmos que estamos detectando antígenos de superfície celular, que podem variar quanto ao seu grau de expressão. Além disto, pacientes renais crônicos politransfundidos podem apresentar aloanticorpos com diferentes graus de avidade, ao contrário das pacientes AER imunizadas especificamente.

Cabe ainda ressaltar que uma das desvantagens do método CDC-AGH é a sua dependência da viabilidade celular, o que poderia levar a resultados falso positivos.

Alguns autores encontraram maior nível de RCP, com o método CDC-AGH, em comparação com o CDC, ao avaliar 114 amostras de soro de pacientes renais crônicos (Duquesnoy & Marrari, 1997). No presente trabalho, a distribuição dos 15 pacientes em diferentes faixas de RCP não mostrou diferença estatisticamente significativa ao se utilizar os

métodos CDC, CDC-AGH ou CELISA. Embora neste estudo o teste CDC-AGH tenha se mostrado mais eficaz na determinação da especificidade de aloanticorpos, dirigidos tanto para especificidades privadas como públicas. Mesmo assim, o teste CELISA se mostrou como uma alternativa prática para definir o grau de reatividade contra painel, principalmente se considerarmos sua capacidade de também detectar anticorpos não citotóxicos, independência de células viáveis, e sua parcial automação. Além disto, autoanticorpos, considerados como não prejudiciais ao transplante, normalmente detectados pelos métodos de citotoxicidade, não parecem ser revelados pelo método CELISA. Isto, provavelmente, se deve ao fato de estes anticorpos serem da classe IgM ou de baixa avidade, que se desprenderiam pelos processos de lavagem. Constatações semelhantes também foram feitas por outros autores, comparando os métodos CDC-AGH e PRA-STATTM (Bryan et al., 1995; Buelow et al., 1995^a; Buelow et al., 1995^b).

Entretanto, deve-se ressaltar que foram observadas reações discordantes não explicadas entre os 3 métodos. Assim, estudo com um número maior de pacientes politransfundidos ou múltiparas poderia contribuir para esclarecer este ponto.

Relevância Clínica dos Aloanticorpos detectados pelo Método CELISA na Evolução do Enxerto Renal

O objetivo deste trabalho foi verificar a adequação do método CELISA na definição da RCP e não na prova cruzada pré-transplante, devido a sua inadequação ao tempo disponível para liberação do resultado. Entretanto, a prova foi realizada posteriormente em 18 casos. A prova cruzada pré transplante positiva com o método CELISA previu reação imunológica em apenas 1 dentre 3 casos, ocorrida após 3 meses do transplante e diagnosticada como glomerulonefrite membranoproliferativa. Infelizmente, com estes 3 casos não foi possível tirar maiores conclusões a respeito, principalmente, se se considerar que a outra perda foi devida a trombose vascular, provavelmente mecânica e, o terceiro caso vem apresentando boa evolução. Sabe-se que pacientes transfundidos podem desenvolver anticorpos não citotóxicos bloqueadores dos receptores Fc (MacLeod et al., 1982), ou anti Fab (Chia et al., 1982) correlacionados com boa evolução do enxerto. Embora tenham sido utilizados linfócitos T do doador no teste CELISA, é possível que, na suspensão celular, existissem linfócitos T ativados ou mesmos células B ou monócitos expressando receptores FC. Adicionalmente, os linfócitos B poderiam fixar anticorpos anti-Fab, por apresentarem imunoglobulinas de superfícies. Estes fatos explicariam a boa evolução do paciente com prova cruzada positiva, detectada pelo método CELISA, e não revelada pela microlinfocitotoxicidade.

Outros autores utilizaram antígeno HLA solúvel extraído de células ou plasma do doador fixado em placas de ELISA por um anticorpo monoclonal anti-HLA classe I. Neste trabalho, foram observadas 3 perdas imunológicas, entre 14 (21%) pacientes com prova

cruzada positiva e 6 perdas imunológicas, entre 149 (4%) pacientes transplantados com prova cruzada negativa (Monteiro et al., 1997). Entre os nossos 15 pacientes com prova cruzada negativa pelo método CELISA, apenas 2 (13%) apresentaram perdas relacionadas a possíveis causas imunológicas.

No estudo da RCP, em nenhum dos 22 casos foi observado qualquer grau de reatividade com o método CELISA. Entre os 11 pacientes com perda renal relacionada a fatores imunológicos, 2 apresentaram reatividade no método CDC-AGH, 1 com 82% e outro com 32%, sendo, porém, um caso de retransplante. Outro paciente, apresentando 17 % de RCP, vem mostrando boa evolução do enxerto, sem nenhum episódio de rejeição em 54 meses de seguimento.

É preciso levar em consideração que, neste estudo, foram incluídos pacientes transplantados na vigência de prova cruzada contra linfócitos T negativa pelo método CDC-AGH. E que resultados positivos em painel não são, necessariamente, anticorpos dirigidos a antígenos HLA clássicos (ou não HLA) presentes nas células do doador. É possível que os métodos CELISA e CDC-AGH estejam revelando antígenos de superfície que diferem quanto a sua expressão, natureza dos epítomos antigênicos, e que eventuais alterações conformacionais interfeririam no grau de avidade do anticorpo específico (Steward & Lew, 1985).

Outra explicação para esta falta de sensibilidade do método CELISA seria a natureza IgM do anticorpo não detectada pelo conjugado anti-IgG, utilizado neste trabalho. Autoanticorpos da classe IgM são considerados não prejudiciais ao transplante, principalmente aqueles resultantes da ativação policlonal em virtude de infecções virais. Todavia, nem toda reatividade contra painel devida a anticorpos IgM pode ser considerada como autoanticorpos. Na realidade, tem sido descrito que alguns pacientes desenvolvem exclusivamente aloanticorpos da classe IgM específicos para antígenos HLA. (Möller et al, 1993). A importância destes aloanticorpos na sobrevivência do enxerto tem sido controversa na literatura. Alguns autores não os consideram prejudiciais, pois representariam um estado de expansão clonal mínima, isto é, de ativação apenas das células T auxiliaadoras 1 (Th1); e a terapia imunossupressora controlaria a ativação das células T auxiliaadoras 2 (Th2), evitando a mudança da classe do aloanticorpo para IgG. A presença de aloanticorpos da classe IgG representaria um estado de expansão clonal importante, onde as células Th1, Th2 e B estariam ativadas, levando à produção de anticorpos com alta afinidade; e a terapia imunossupressora não evitaria a expansão secundária destes clones na vigência do transplante (Scornik et al, 1992). Entretanto, outros autores têm dado importância para a resposta primária IgM específica para aloantígeno, pois esta poderá evoluir para uma resposta secundária na vigência do transplante (Möller et al, 1993).

Outro fator importante que explicaria a não reatividade do soro no método CELISA seria

a própria qualidade do conjugado anti-IgG, utilizado como revelador da presença do aloanticorpo. Alguns autores têm descrito que diferentes fontes de conjugados podem resultar em diferentes sensibilidades do método (Morris et al., 1982; Avrameas, 1992; Kemeny, 1992). Assim, é possível que a utilização de outras fontes de conjugados comerciais, além daquela aqui utilizada, poderia ser útil para esclarecer este ponto. Além disto, conjugados específicos para anticorpos da classe IgM também poderiam ser empregados para definir a presença de aloanticorpos, em amostras de soro previamente absorvidas com células do próprio paciente, para a retirada das IgM autorreativas, aparentemente não prejudiciais.

Para determinar a relevância da sensibilização contra estes diferentes antígenos, seria necessário incluir no estudo de um maior número de pacientes transplantados com boa e má evolução do enxerto.

Resumo e Conclusões

Convencionalmente, a sensibilização aos antígenos HLA é definida pelo nível de reatividade do soro do paciente contra painel de linfócitos de pelo menos 30 indivíduos HLA distintos, empregando-se o método de citotoxicidade dependente de complemento (CDC). A necessidade de obtenção de linfócitos viáveis torna o método difícil de ser processado num curto espaço de tempo. O presente trabalho teve por objetivos: a padronização do método CELISA, passível de automação, utilizando-se suspensões desidratadas de linfócitos T, armazenadas em microplacas a -20°C ; e a avaliação de sua sensibilidade e especificidade em relação ao método de CDC e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH). Partindo de soros controles HLA-positivos e HLA-negativos, foram avaliados os seguintes pontos: tipo de placas poliestireno disponíveis no mercado; tampões bloqueadores de sítios inespecíficos; concentração do conjugado e métodos de tratamento do soro, descritos a seguir.

Com o uso de solução bloqueadora constituída de tampão TRIS/HCL (pH 7,6), 0,1% de Triton-X-100, 1% de soro de coelho e 3% de leite em pó desnatado, os três tipos de placas avaliadas mostraram resultados semelhantes.

Recomenda-se portanto, o uso de 5×10^4 linfócitos por escavação (50ul de 1×10^6 /PBS), devido ao fato de que concentrações maiores resultaram em aumento de reações inespecíficas e concentrações menores diminuíram a sensibilidade do teste.

Antes da realização dos testes, as amostras de soro devem ser previamente congeladas, posteriormente tratadas com trombina e centrifugadas, pois soros de alguns pacientes com desordem de coagulação, apresentam restos de fibrina, mesmo após a retração do coágulo, levando a resultados falsos-positivos.

A comparação de 226 provas cruzadas revelou 75,2 % de concordância entre os métodos CELISA e CDC e 81,4% entre os métodos CELISA e CDC-AGH, utilizando-se soros de gestantes no primeiro trimestre de gestação e pacientes renais crônicos politransfundidos.

Em relação à boa ou à má evolução do enxerto renal, não foi possível avaliar a relevância de aloanticorpos detectados pelos métodos CELISA ou CDC-AGH, devido ao pequeno número de pacientes transplantados, incluídos no estudo.

Finalmente conclui-se que o método de CELISA se mostrou útil para a pesquisa de anticorpos anti-linfocitários, com sensibilidade compatível com o método CDC potencializado por AGH. Entretanto, anticorpos da classe IgM ou de baixa avidade não seriam detectados pelo método CELISA. Este fato, porém, não invalida o objetivo proposto, de determinação do nível de RCP na amostra pré-transplante. O método também pode ser empregado, rotineiramente, para acompanhar a evolução da RCP em amostras de soro de pacientes renais crônicos, colhidas ao longo do tempo. Quando não for possível a caracterização das especificidades, recomenda-se a realização da RCP pelo método CDC-AGH, que, embora mais trabalhoso e dependente de células viáveis, é, como o CELISA, nitidamente mais sensível que o método CDC clássico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amos, D.B.; Bashir, H.; Boyle, W. Mac Queen, J.M.; Tilikainen, A. - A Simple Microcytotoxicity Test.-*Transplantation* 1969, 7: 220.In: Zachary, A.A.; Klingman, L.; Thorne, N.; et al Variations of the lymphocytotoxicity test - *Transplantation*, 60 (5): 498-503, 1995.
- Arunachalam, B.; Talwar,G.P.; Raghupathy, R. - A simplified cellular ELISA (CELISA) for detection of antibodies reacting with cell-surface antigens - *J. Immunol. Meth.*, 135: 181-189, 1990.
- Avrameas, S. - Amplification systems in immunoenzymatic techniques - *J. Immunol. Meth.*, 150: 23-32, 1992.
- Bishai, F.R. & Galli, R.- Enzyme-linked immunosorbant assay for detection of antibodies to Influenza A & B Parainfluenza Type I in sera of Patients. - *J. Clin Microbiol*, 8: 648-656, 1978.
- Bodmer, J.G.; Marsh, S.G.E.; Albert, E.D.; Bodmer, W.F.; Bontrop, R.E.; Charron,D.; Dupont, B.; Erlich,H.A.; Fauchet, R.; March, B.; Mayr, W.R.; Parham, P.; Sasazuki, T.; Schreuder, G.M.T.; Strominger, J.L.; Svejgaard, A.; Terasaki, P.I. - Nomenclature for factors of HLA system, 1996- In: Charron, D.(ed) - **Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication -Vol 1** - EDK - Medical and Scientific International Publisher- 1997. P. 505-532
- Boyum, A. - Separation of leukocytes from blood and bone marrow. - *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21(suppl): 97-101, 1968
- Braun, W.E. - Fifteen years of HLA: what is the importance of HLA compatibility for clinical outcome of renal transplantation?- *Vox. Sang.*, 34: 171-188, 1978.
- Braun, W.E.- Laboratory and clinical managemente of the highly sensitized organ transplant recipiente. – *Hum. Immunol.* 26: 245-260, 1989.
- Bryan, C.F.; Baier, K.A.; Flora-G.G.; Shield III, C.F.; Warady, B.A.; Aeder, M.I.; Borkon, M.; Estep, T.H.; Forster, J.; Landreneau, M.D.; Luger, A.M.; Nelson, P.W.; Ross, G. E.; Pierce, G.F. - Detection of HLA IgG antibodies by two enzyme-linked immunoassays, solubilized HLA class I and PRA-Stat.- *Transplantation*, 60(12): 1588-1594, 1995.
- Buelow, R.; Chiang, T.R.; Monteiro, F. Cornejo, M.C.; Ellingson, L.; Claas, F.; Gaber, O.; Gelder, F.; Kotb, M.; Orosz, C.; Pouletty, P.- Soluble HLA antigens and ELISA - A new technology for crossmatch testing. - *Transplantation*, 60 (12): 1594-1599, 1995^a.
- Buelow, R.; Mercier, I.; Glanville, L.; Regan, J.; Ellingson, L.; Janda, G.;Class, F.; Colombe, B.; Gelder, F.; Grosse-Wilde, H.; Orosz,C.; Westhoff, U.; Voegeler, U.; Monteiro,F.; and Pouletty, P.- Detection of panel-reactive anti-HLA class I antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay or lymphocytotoxicity.- *Hum. Immuno.* 44: - 1-11 1995^b.
- Cantarero,L.A.; Butler, J. E. & Osborne, J.W. - The adsorptive characteristics of proteins for poystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. – *Anal. Biochem.* 105(2): 375 - 382, 1980.

- Capitanio, A. Mannucci, P.M; Ponticelli, C.; Pareti, R. - Detection of circulating released platelets after renal transplantation. - **Transplantation**- **33(3)**: 298-301, 1982.
- Carlier, Y. ; Bout, D. Capron, A.- Enzymo-Immunoassays- **Bulletin Del'Institut Pasteur**- **79(4)**: 313-382, 1981
- Carrol, K.; Lannon, B.; O'kenney, R. - Optimal fixation of cells for use in solid-phase ELISA. - **J. Immunol. Meth.**, **129**: - 71-76, 1990.
- Castaldi, P.A., Rozenberg, M.C.; Stewart, J.H.- The bleeding disorder of uraemia: a qualitative platelet defect. - **Lancet** **2**: 66-69, 1966.
- Catt, K. & Tregear, G.W. - Solid phase radioimmunoassay in antibody - coated tubes. **Science** **158**: 1570-1576, 1967.
- Chapman, J.R.; Taylor, C.J.; Ting, A.; Morris, P.J.- Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches- **Transplantation**, **42(6)**: 608-613, 1986.
- Chia,D.; Horimi,T.; Terasaki,P.I. & Hetmes, M. - Association of anti-Fab and anti-IgG antibodies with high kidney transplant survival. **Transplant. Proc.** **14(2)**: 322- 324, 1982
- Clark, B. R.; Engvall, E. - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Theoretical and practical aspects -in Edward T. Maggio (ed.) - **Enzyme-Immunoassay** ., CRC Press, Inc. 7^o Ed, 1988. p. 168-179
- Cobbold, S. PI & Waldmann, H. - A rapid solid-phase enzyme-linked binding assay for screening monoclonal antibodies to cell surface antigens- **J. Immunol. Meth.**, **44**: 125-133, 1981.
- Colombani, J. ; Colombani, M.; Shreffler, D. & David, C. - A lymphocyte and platelet complement fixation microtechnique for the study of H-2 region and I region-associated (Ia) antigens. - **Transplantation** **20**: 84-88, 1974.
- Craig, W. Y. Poulin, S. E.; Collins, M.F.; Ledue,T.B.; Ritchie, R.F. - Background staining in immunoblot assays- **J. Immunol. Meth.**, **158**: 67-76, 1993.
- Cross, D.E.; Greiner, R.; Whittier, F.C. - Importance of the autocontrol crossmatch in human renal transplantation. - **Transplantation**- **21(4)**: 307-311, 1976.
- Dahlke, M.B.; Weiss, K.L.- Platelet transfusion from donors mismatched for crossreactive HLA antigens.- **Transfusion** **24**: 299-302, 1984.
- Dausset, J. - Leuco-agglutinins. IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. **Vox.Sang.** **4**: 190-194, 1954.
- Dausset, J. ; - HLA Complexe Majeur D'histocompatibilité de L'Homme. Dausset, J. & Pla, M. (ed), Flammarion Médecine Sciences., 1989. 589pp
- Dimitriadis , G.J. - Effect of detergents on antibody-antigen interaction - **Anal. Biochem.** **98**: 445-451, 1979.
- Drover, S. & Marshall, W.H. - Glutaraldehyde fixation anti-HLA antibodies produces artefacts .- **J. Immunol. Meth.**, **90**: - 275-281, 1986.

- Duquesnoy, R. & Marrari, M., for a Collaborative Study Conducted during the 12th International Workshop - Determination of HLA-A,B Residue Mismatch acceptability for kidneys transplanted into highly sensitized patients. **Transplantation** 63: 1743-1751, 1997.
- Effros, R. B.; Zeller, E.; Dillard, L.; Walford, R.L. - Detection of antibodies to cell surface antigens by a simplified cellular elisa (CELISA) - **Tissue Antigens** 25: 204-211, 1985.
- Eisen H.N.; Siskind, G.W.- Variations in affinities of antibodies during the immune response -, **Biochemistry** 3: 996-1008, 1964.
- Engvall, E. & Perlmann, P. - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). quantitative assay of immunoglobulin G.- **Immunochemistry**, 8: 871-875, 1971.
- Engvall, E. & Perlmann, P.- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).III. quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. - **J. Immunol.** 109:-129-134, 1972.
- Ettenger, R.B.; Uittenbogaart, C.H.; Pennisi, A.J.; Malekzadeh M.H.; Fine, R.N.- Long -term cadaver allograft survival in the recipient with a positive B lymphocyte crossmatch.- **Transplantation- 27(5):** 315-318, 1979.
- Fernandez, F. Goudable, C. Sie P.; Ton, That, H.; Durand, D.; Suc, J.M.; Boneu, B. - Low haematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red cell transfusions. - **Br. J. Haematol** 59: 139-148, 1985.
- Festenstein, H. & Schmit, W. - Variation in MHC antigenic profiles of tumor cells and its biological affects - **Immunol. Rev.** 60: 85-127, 1981
- Gardas, A.; Lewartowska, A. - Coating of proteins to polystyrene ELISA plates in presence of detergents - **J. Immunol. Meth.**, 106: 251-255, 1988.
- Garovoy M.R., Rheinschmidt A.; Bigos, M.; Perkins, H.; Colombe, B.; Feduska, N.; Salvatierra, O.; - Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. - **Transplant Proc.** 15: 1939-1943, 1983
- George, C.R.; Slichter, S.J.; Quadracci L.J.; Striker, G.E.; Harker, L.A. - A kinetic evaluation of hemostasis in renal disease.- **N. Engl. J. Med.**- 291(21): 1111-1115, 1974.
- Glass, N.R. ; Miller, D.T.; Sollinger, H.W.; Belzer, F.O.I. - Renal allograft prognosis as a function of pre-transplant parameters including transfusion history. **Transplant. Proc.** 14: 290-292, 1982.
- Gripenberg, M.; Kurki, P.; - Demonstration of human autoantibodies by quantitative enzyme immunoassays - **J. Immunol. Meth.**, 92: 145-159, 1986.
- Harris, M.C.; Kolski, G. B.; Campbell, D.E.; Deuber, C.; Marcus, M. & Douglas, S.D. - Ontogeny of the antibody response to cow milk proteins.- **Ann. Allergy** 63: 439-442, 1989
- Hedman, K.; Hietala J., Tiilikainen A., Hartikainen-Sorri A-L, R  ih   K., Suni, J.; Vaananen, P.; Pietilainen, M.- Maturation of immunoglobulin G avidity after rubella vaccination studied by an enzyme linked immunosorbent assay (avidity-ELISA) and by haemolysis typing. - **J. Medical Virology** 27(4): 293-298, 1989.

- Helenius, A. Mccaslin, D. R.; Fries, E.; Tanford, C. - Properties of detergents - **Methods. in Enzymology**, **56**:, 734-749, 1979.
- Hopkins, K.A.;- The basic lymphocyte microcytotoxicity test. In: Zachary, A.A., Teresi, G.T. Eds. **The ASHI Laboratory Manual**, 2^a Ed. Lenexa, KS: The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 195: 1990.
- Innes, A. ; Cunningham, C. Power, D.A. E Catto, G.R.D.- Fetus as an allograft: noncytotoxic maternal antibodies to HLA linked paternal antigens- **Am. J. Reprod. Immunol.** **19**: 146-150, 1989
- Iwaki, Y.; Lau, M.; Cook, D.J.; Takeomoto, S.; Terasaki, P.I. - Crossmatching with B and T cell and flow cytometry - **Clinical. Transplantation** 277-284, 1986
- Iwaki, Y., Cook, D.J.; Terasaki, P.I.; Lau, M.; Terashita, G.Y.; Danovitch, G. Fine, R.; Ettenger, R. Mendez, R. Kavalich, A.; Martin, D.; Soderrblom, R.; Ward, H.; Berne, T.; Lieberman, E.; E Strauss, F. - Relevance of crossmatch finding and methodology - flow cytometry crossmatching in human cadaver kidney transplantation- **Transplant. Proc.** **18(1)**: 764-766, 1987
- Johnson, A.H.; Rossen, R.D., Butler, W.T. - Detection of alloantibodies using a sensitive antiglobulin microcytotoxicity test: identification of low levels of preformed antibodies in accelerated allograft rejection. - **Tissue Antigens** - **2**: 215-220, 1972.
- Kao, K. J.; Scornik, J.C.; Small, S. J.- Enzyme Linked Immunoassay for anti-HLA antibodies - an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity- **Transplantation**- **55(1)**: 192-196, 1993.
- Kao, K.J.; Cook, D.J.; Scornik, J.C.- Quantitative analysis of platelet surface HLA by W6/32 anti-HLA monoclonal antibody. - **Blood**- **68**: 627-632, 1986.
- Kaufman, E.N. & Jain, R.K.; - Effect of bivalente interaction upon apparent antibody affinity - experimental confirmation of theory using fluorescence photobleaching and implications for antibody binding assays. - **Cancer Res.** **52**: 4157-4164, 1992.
- Kemeny, D.M. - Titration of antibodies - **J. Immunol. Meth.**, **150**: 57-76, 1992.
- Kenna, J.G.; Major, G.N.; Williams, R.S. - Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbant assay.- **J. Immunol. Meth.**, **85**: 409-419, 1985.
- Keros, L.G., Lambert, T.; Dubreuil, P., Briantais, M.J.; Pillot, J. - False reactions in radioimmunoassay for viral hepatitis B markers in patients suffering from coagulation disorders - **Vox. Sang.** **42**: 160-163, 1982.
- Kincaid-Smith P.- Coagulation and renal disease.- **Kidney Int.** **2**: 183-190, 1972.
- Kissmayer-Nielsen F.; Olsen, F.; Petersen, V.; Fjeldborg, O. - Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. - **Lancet** **2**: 662-665, 1966.
- Kuen, L.S.; Ming, C.H.; Fan, Y.S.- Background noise In ELISA procedures . Influence of the pH of the coating buffer and correlations with serum IgM Concentration - **J. Immunol. Meth.**, **63**: 277-278, 1993.

- Larsson, A.- Divalent binding of monoclonal antibody to a cell surface antigen. Modelling of equilibrium data.- **Mol. Immunol.** **26**: 735-739 - 1989.
- Lehtonen, O. P. & Viljanen, M.K.; -Antigen attachment in ELISA —**J. Immunol. Meth.**, **34**: 61-70, 1980.
- Lieber, S.R. - **Antígenos HLA em linfócitos humanos tratados com paraformaldeído** - Tese de Mestrado do Curso de Pós -Graduação em Microbiologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina-, São Paulo SP.- 1982.
- Lieber, S.R.; Gerbase De Lima, M; Persoli, L.B.; Pedro, F.; Setta, J.H.; Montanha, W. & Pestana, J.O. - Lymphocytotoxic antibodies in 1500 potencial first kidney transplant recipients. - **Transplant. Proc.** **24 (6)**: 3072-3073, 1992^a
- Lieber, S.R.; Gerbase de Lima, M. & Pestana, J.O.M. - Blood transfusions and serum-effect of chronic renal patients in lymphocyte proliferative response. **Rev. Paulista de Medicina** **110 (5)**: tm27, 1992^b.
- Livio, M.; Gotti, E.; Marchesi, D.; Mecca, G.; Remuzzi, G.; de Gaetano, G. - Uraemic bleeding: role of anaemia and beneficial effect of red cell transfusions. -**Lancet** **2**: 1013-1015, 1982.
- Lutz, H.U.; Stammler, P.; Fischer, E.A. - Covalente binding of detergent-solubilized membrane glycoproteins to "chemobond" plates for ELISA.- **J. Immunol. Meth.** **129**: 211-220, 1990.
- MacLeod, A.M.; Power - D.A.; Mason, R.J.; Stewart, R.J.; Shewan, W.G.; Edward, N.; Catto, G.R. — Possible mechanism of action of transfusion effect in renal transplantation . **Lancet** **2**: 468-470, 1982
- Mc. Devitt, H.O. - Regulation of imune response by the Major Histocompatibility System. - **N. Engl. J.Med.**, **303**: 1514-1517, 1980.
- Mohanakumar, T.; Giedlin M.A.; Rhodes, C.L.Jr.; DuVall, C.H.; Mendez-Picon, G.; Kaplan, A.M.- Relationship of B cel alloantibodies to renal allograft survival- **Transplantation**, **27(4)**:, 273-278, 1979
- Moia, M.; Mannucci, P.M.; Vizzotto, L, Casati, S.; Cattaneo, M.; Ponticelli, C.- Improvemente in the haemostatic defect of uraemia after treatment with recombinant human erythropoietin. - **Lancet** **2**: 1227-1229, 1987.
- Möller, E.; Karuppan, S. & Talbot, D. - Workshop report: clinical relevance of new crossmating techniques. - **Transplant. Proc.** **25**: 176-179, 1993.
- Monteiro, F.; Rodrigues, H.; Viggiani, C.; Lanhez, L.E.; Kalil, J. -Crossmatch testing of organ and recipients by cross-stat ELISA: clinical relevance of test results - In: Charron, D.(ed) - **Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication** - Vol 2, - EDK - Medical and Scientific International Publisher - Paris 1997. p. 551-553
- Moore, A.; Nachman, R.L.- Platelet Fc Receptor. Increased expression in myeloproliferative disorders. - **J. Clin Invest.** **67**: 1064-1071, 1981.
- Morris, R. E.; Thomas, P.T.; Hong, R. - Cellular Enzyme-Linked Immunospecific Assay (CELISA) . I - A new micromethod that detects antibodies to cell- surface antigens.- **Hum. Immunol.** **5**: 1-19, 1982.

- Nehlsen-Cannarella, S.L.; Buckert, L.; Fagoaga, O. Folz, J.;Grinde, S.; Hisey, C.; Schmitt,R.; Zappia, J.- Assessement of three methods of evaluating soluble class I HLA molecules in cell culture supernatants and serum samples from the second international workshop on soluble human leukocyte antigens- **Hum. Immunol.** **40**: 210-217, 1994.
- Nepom, B.S. & Nepom, G.T., - Polyglot and polymorphism - An HLA update - **Arthritis & Rheumatism** **38 (12)**: 1715-1721, 1995
- Neugebauer, J.M. - Detergents: an overview - **Methods. in Enzymology**, **182**: 239-253, 1990.
- Ogura, K.; Terasaki, P.I.; Johnson, C.; Mendez, R.; Rosenthal, J.T.; Ettenger, R.; Martin, d.c.; Dainko, E.; Cohen, L.; Mackett,T.; Berne,T.; Barba,L.; and Lieberman, E.- The significance of a positive flow cytometry crossmatch test in primary kidney transplantation.- **Transplantation**, **56**: 294-298, n°2, 1993.
- Opelz ,G. - The role of HLA matching and blood transfusions in the cyclosporine era. Collaborative transplant study. – **Transplant. Proc.** **21**: 609-612, 1989.
- Opelz G; Graver, B.; Mickey M.R.; Terasaki, P.I.- Lymphocytotoxic antibody responses to transfusions in potential kidney transplant recipients.- **Transplantation**, **32(3)**: 177-183, 1981.
- Pesce, A.J.; Michael, J.G. - Artifacts and limitations of enzyme immunoassay - **J. Immunol. Meth.** **150**: 111-119, 1992.
- Posner, M.R., Antonious, D., Griffin, J., Schlossman, S.F. and Lazarus, J. - An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies to cell surface antigen on viable cells. - **J. Immunol. Meth.**,**48**: 23-31, 1982.
- Pouletty,C. Mercier, I.; Glanville, L.; Tomavo, N.; Igoudin,L. Pouletty, P. E Buelow,R. - Typing of a panel of soluble HLA class I antigens by enzyme-linked immunosorbent assay – **Hum. Immunol.**, **40**: 218-227, 1994.
- Pratt, R.P. & Roser, B. Comparison Of Blocking Agents For ELISA. - *Nunc Bull.* 7, 1. 1989. In: Kuen, L.S.; Ming, C.H.; Fan, Y.S.- Background noise in ELISA procedures .influence of the pH of the coating buffer and correlations with serum IgM concentration - **J. Immunol. Meth.**, **63**: 277-278, 1993.
- Ravindranath, M.H.; Ravindranath, R.M.H.; Morton, D.L.; Graves, M.C. - Factors affecting the fine specificity and sensitivity of serum antiganglioside antibodies in ELISA - **J. Immunol. Meth.** **169**: 257-272, 1994.
- Riesman, D. - Hemorrhages in the course of Bright's disease, with especial reference to the occurrence of a hemorrhagic diatheses of nephritic origin. - **Am J. Med Sci**, **134**: 709-716, 1907
- Rockoff, S.D., McEntire, K.R.; Ng, A.K.; Prinder, G.L.; Herberman, R. & Larson, J.N. - Sensitive and convenient quantitation of antibody binding to cellular antigens using glutaraldehyde preserved cells. -**J. Immunol. Meth.** **26**: 369-380, 1979.
- Ross, W.B.; Yap, P.L. - Blood transfusion and organ transplantation - **Blood Rev.** **4(4)**: 252-258, 1990

- Rubenstein, K.E.- Homogeneous enzyme immunoassay today. - **Sacand. J. Immunol.** 8: 57-62, 1978.
- Rubiner, S.F.- Bleeding in uraemia.- **Med Clin Norh Am.** 56: 221-223, 1972
- Sanchez, M.C.A., -Testes Sorológicos – in Ferreira A.W; Ávila, S.L.M.(Eds.) **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes** - Guanabara Koogan S.A ed, Rio de Janeiro,RJ., 1996. p. 30-36
- Sanfilippo, F. ; Thacher, C. & Vaughn, W.K. - Living-donor renal transplantation in SEOPF: the impact of histocompatibility, transfusions, and cyclosporine on outcome. -**Transplantation**, 49: 25-29, 1990.
- Schlosser, M.; Witt, S.; Ziegler,B. Ziegler, M.- Influence of target cell preparation on binding of monoclonal islet cell reactive antibodies (Mc- ICRA) in cellular enzyme- linked immunosorbent assay (CELISA) - **J. Immunol. Meth.**, 140: 101-109, 1991.
- Schonheyder, H. ; Andersen, P. - Effects of bovine serum albumin on antibody determination by the enzyme-linked immunosorbent assay - **J. Immunol. Meth.**, 72(1): 251-259, 1984.
- Schwartz, B.D.,- The Human Major Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA) Complex, in: Stites D.P.,Terr, A.I. (Ed).- **Basic And Clinical Immunology**- Appleton & Lange - 1991. p. 45-60
- Scornik, J.C.; Brunson, M.E.; Howard, jR.J.; Pfaff, W.W. - Alloimmunization, memory, and the interpretation of crossmatch results of renal transplantation - **Transplantation**, 54(3): 389-394, 1992.
- Stastny, P.; Austin, C.L. - Successful kidney transplant in patient with positive crossmatch due to autoantibodies. - **Transplantation**, 21(5): 399-402, 1976.
- Stastny, P.; Ball, E.J.; Dry, P.J. & Nunes, G. - The human immune response region (HLA-D) and disease susceptibility.- **Immunol.Rev.** 70: 113-153, 1983.
- Steward ,M.W.; Lew, A.M.- The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody- **J. Immunol. Meth.** 78: 173-190, 1985.
- Stoll, V.S.; Blanchard, J.S. - Buffers: principles and pactice - **Methods In Enzymology**, 182: 24-38, 1990.
- Suter, L.; Brügggen, J. & Sorg, C. - Use of an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for screening of hybridoma antibodies against cell surface antigens. - **J. Immunol. Meth.** 39: 407-411, 1980
- Taborsky, G.; - Phosphoproteins –**Adv. Protein. Chem**, 28: 1, 1974.
- Terasaki, P. I. & McClelland, J.D.- Microdroplet assay of human serum cytotoxins. **Nature** 204: 998-1000, 1964
- Ting, A. - What crossmatches are required in organ transplantation? - **Transplant. Proc.** 21: 659-660, 1989.

- Trowsdale, J.; Campbell, R.D. - The 12th International MHC map.- In: Charron, D.(ed) - **Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication** - Vol 1 - EDK - Medical and Scientific International Publisher, Paris- 1997. p. 499-504
- Trucco, M.; Petris, S.; Garotta, G.; Ceppellini, R. - Quantitative analysis of cell surface hla structures by means of monoclonal antibodies. – **Hum. Immunol.** **3**: 233-243, 1980.
- Underwood, P.A. - Problems and pitfalls with measurement of antibody affinity using solid phase binding in the ELISA. - **J. Immunol. Meth.**, **164**:, 119-130, 1993.
- Van Weeman, B.K. e Schuurs, A.H.W.M.; -Immunoassay using antigen enzyme conjugates - **FEBS Lett.** **15**: 232-235, 1971.
- Voller, A Heterogeneous enzyme-immunoassays and their applications – in: Edward T. Maggio (ed) - **Enzyme-Immunoassay 7°** , CRC Press Inc. Ed, New York, NY., 1988. p. 181-196
- Walker, K.W.; Llull, R.; Balkian, G.K.; Ko, H.S.; Flores, K.M.; Ramsamooj, R.; Black, K.S.; Hewitt, C.W.; Martin, D.C. - A rapid and sensitive cellular enzyme-linked immunoabsorbent assay (CELISA) for the detection and quantitation of antibodies against cell surface determinants. - **J. Immunol. Meth.**, **154**: 121-130, 1992.
- Zachary, A.A.; Griffin, J.; Lucas, D.P.; Hart, J.M.; Leffell, M.S. - Evaluation of HLA antibodies with the PRA-Stat test- **Transplantation**, **60**(12): 1600-1606, 1995.

SOLUÇÕES

TAMPÃO TRIS-HCL , pH 7,6 10mM.

Solução mãe de TRIS-HCl 0,2M : pH 7,6.

A: 0,2M de solução de Tris (hidroximetil) aminometano (24,2g em 1000ml)

B: 0,2M HCL

50ml de A + 38,4 ml de B, diluído para um total de 200ml

Solução de rotina (10mM) :

Solução de NaCl 154mM:.....1000ml

Solução TRIS-HCl 0,2M.....50ml

SOLUÇÃO DE LAVAGEM

Tampão TRIS-HCl 10mM pH 7,6.....1000ml

Triton -X- 100.....0,5ml

TAMPÃO BLOQUEADOR

Tampão TRIS-HCl 10mM pH 7,6.....100ml

Triton-X-100.....0,1ml

Soro de coelho.....0,1ml

Leite em pó desnatado.....3,0 g.

TAMPÃO BIFOSFATO DE SÓDIO (PBS) - AZIDA

PBS (BIOLAB) pH 7,2.....1000 ml água destilada
Azida Sódica (E. Merck AG, Darmstadt - Germany).....1 g.

SOLUÇÃO FICOLL-HYPAQUE:

Ficoll-2000 (Pharmacia Fine Chemical, Upsalla, Suíça).....350ml a 9% em água destilada
Hypaque (Whinthorop Products Inc., New York, USA).....100ml a 50%.

Água destilada.....47,5ml.

Ajustar a densidade para 1,076 com água destilada.

Autoclavar e manter a 4°C, em frasco âmbar.

SOLUÇÃO SALINA BALANCEADA DE HANKS

TC Hanks Salt Solution, Difco Laboratories, Michigan, USA.

Antes do uso, o pH foi ajustado para 7,2 com solução de bicarbonato de sódio a 7g% ou ácido acético a 2 g %.

SOLUÇÃO FISIOLÓGICA:

Solução de cloreto de sódio (Merck Laboratórios S.A, Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil), a 0,9g% em água destilada.

SOLUÇÃO DE AZUL TRIPAN:

Azul Tripan (Matheson, Coleman & Bell Norwood, Ohio, USA).....1g

Água destilada.....100ml

Solução conservada a 4°C. Imediatamente antes do uso diluir a 1:4 em solução de Hanks.

SORO DE COELHO

Para o uso como fonte de complemento nas reações de citotoxicidade dependente de complemento, bem como para enriquecimento do tampão bloqueador no CELISA, foi utilizado soro de coelho, obtido por punção cardíaca de sangue de cerca de 50 coelhos Nova Zelândia, adultos e aparentemente sadios. O sangue colhido foi transferido para tubos de vidro e deixado, por uma hora, à temperatura ambiente e, por 2 a 3 horas, a 4°C. Logo após a retração do coágulo, os soros foram centrifugados a 1000g durante 10 minutos a 4°C, misturados e mantidos em alíquotas de 1ml a - 80 °C. Antes de ser utilizado como fonte de complemento, o soro foi estudado quanto à potência e ao efeito citotóxico inespecífico, através de reação com soros e células selecionadas.

SOLUÇÃO CROMOGENICA

O-phenilenodiamina 2 HCL, 1,0 mg/ml (Sigma Chemical Company nº p-8287), em tampão citrato-fosfato, 0,05M , pH 5,0 contendo 0,03% de perborato de sódio - Sigma Chemical Company, St. Louis, USA- nº P 4922).

ACIDO SULFÚRICO 1N H_2SO_413,8ml H_2O destilada qsp.....500ml

Anexo- 02

Prova cruzada entre soro de gestantes e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

**Experimento
1**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC Interpretação	CDC-AGH Interpretação
G1	0,312	Negativo	POSITIVO	POSITIVO
G2	0,333	Negativo	Negativo	Negativo
G3	0,338	Negativo	negativo	negativo
G4	0,307	negativo	negativo	negativo
G5	0,385	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
G6	0,264	negativo	negativo	negativo
G7	0,331	negativo	negativo	negativo
G8	0,426	POSITIVO	negativo	negativo
G9	0,292	negativo	negativo	negativo
G10	0,379	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle positivo	0,583	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,333 ± 0,005		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,343			

**Experimento
2**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC Interpretação	CDC-AGH Interpretação
G1	0,286	Negativo	Negativo	Negativo
G2	0,274	Negativo	Negativo	Negativo
G3	0,276	negativo	negativo	negativo
G4	0,298	negativo	negativo	negativo
G5	0,434	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
G6	0,248	negativo	negativo	negativo
G7	0,291	negativo	negativo	negativo
G8	0,350	negativo	negativo	negativo
G9	0,255	negativo	negativo	negativo
G10	0,386	POSITIVO	negativo	POSITIVO
Controle positivo	0,575	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,330 ± 0,012		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,354			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA : foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).
2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

ANEXO 2 (continuação)

Prova cruzada entre soro de gestantes e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

**Experimento
3**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
G1	0,255	Negativo	POSITIVO	POSITIVO
G2	0,264	Negativo	Negativo	Negativo
G3	0,265	negativo	negativo	negativo
G4	0,314	negativo	negativo	negativo
G5	0,369	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
G6	0,229	negativo	negativo	negativo
G7	0,265	negativo	negativo	negativo
G8	0,337	POSITIVO	negativo	negativo
G9	0,240	negativo	negativo	negativo
G10	0,386	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle positivo	0,527	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,299 ± 0,009		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,317			

**Experimento
4**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
G1	0,185	Negativo	Negativo	Negativo
G2	0,175	Negativo	Negativo	Negativo
G3	0,171	negativo	negativo	negativo
G4	0,160	negativo	POSITIVO	negativo
G5	0,320	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
G6	0,134	negativo	negativo	negativo
G7	0,171	negativo	negativo	negativo
G8	0,253	POSITIVO	negativo	negativo
G9	0,149	negativo	negativo	negativo
G10	0,243	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle positivo	0,535	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,172 ± 0,010		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,192			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).

2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

ANEXO 2 (continuação)

Prova cruzada entre soro de gestantes e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

**Experimento
5**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
G1	0,516	POSITIVO	Negativo	POSITIVO
G2	0,444	Negativo	Negativo	Negativo
G3	9,432	negativo	negativo	negativo
G4	0,457	negativo	Negativo	negativo
G5	0,587	POSITIVO	Negativo	Negativo
G6	0,355	negativo	negativo	negativo
G7	0,423	negativo	negativo	negativo
G8	0,501	POSITIVO	negativo	POSITIVO
G9	0,374	negativo	negativo	negativo
G10	0,622	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle positivo	0,600	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,433 ± 0,015		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,463			

**Experimento
6**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
G1	0,506	POSITIVO	Negativo	POSITIVO
G2	0,493	POSITIVO	Negativo	POSITIVO
G3	0,437	negativo	negativo	negativo
G4	0,477	POSITIVO	Negativo	negativo
G5	0,521	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
G6	0,354	negativo	negativo	negativo
G7	0,452	negativo	negativo	negativo
G8	0,449	negativo	negativo	negativo
G9	0,379	negativo	negativo	negativo
G10	0,583	POSITIVO	negativo	POSITIVO
Controle positivo	0,637	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,431 ± 0,020		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,471			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA : foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).

2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

ANEXO 2 (continuação)

Prova cruzada entre soro de gestantes e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

**Experimento
7**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
			CDC	CDC-AGH
	D.O.	Interpretação	Interpretação	Interpretação
G1	0,472	POSITIVO	Negativo	POSITIVO
G2	0,421	Negativo	Negativo	Negativo
G3	0,426	negativo	negativo	negativo
G4	0,453	POSITIVO	Negativo	negativo
G5	0,516	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
G6	0,373	negativo	negativo	negativo
G7	0,435	POSITIVO	negativo	negativo
G8	0,490	POSITIVO	negativo	negativo
G9	0,380	negativo	negativo	negativo
G10	0,559	POSITIVO	negativo	Negativo
Controle positivo	0,610	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,417 ± 0,008		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,433			

**Experimento
8**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
			CDC	CDC-AGH
	D.O.	Interpretação	Interpretação	Interpretação
G1	0,472	POSITIVO	Negativo	POSITIVO
G2	0,421	Negativo	Negativo	Negativo
G3	0,426	negativo	negativo	negativo
G4	0,453	negativo	Negativo	negativo
G5	0,516	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
G6	0,373	negativo	negativo	negativo
G7	0,435	negativo	negativo	negativo
G8	0,490	POSITIVO	negativo	negativo
G9	0,380	negativo	negativo	negativo
G10	0,559	POSITIVO	negativo	POSITIVO
Controle positivo	0,603	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,433 ± 0,015		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,463			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).

2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

ANEXO 2 (continuação)

Prova cruzada entre soro de gestantes e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

**Experimento
9**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
G1	0,368	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
G2	0,317	Negativo	Negativo	Negativo
G3	0,310	negativo	negativo	negativo
G4	0,223	negativo	negativo	negativo
G5	0,632	POSITIVO	negativo	negativo
G6	0,299	negativo	negativo	negativo
G7	0,315	negativo	negativo	negativo
G8	0,417	POSITIVO	negativo	negativo
G9	0,306	negativo	negativo	negativo
G10	0,449	POSITIVO	negativo	negativo
Controle positivo	0,747	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,307 ± 0,0185		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,344			

**Experimento
10**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
G1	0,427	POSITIVO	negativo	negativo
G2	0,335	POSITIVO	Negativo	Negativo
G3	0,273	negativo	negativo	negativo
G4	0,328	POSITIVO	negativo	negativo
G5	0,405	POSITIVO	negativo	negativo
G6	0,243	negativo	negativo	negativo
G7	0,257	negativo	negativo	negativo
G8	0,255	negativo	negativo	negativo
G9	0,232	negativo	negativo	negativo
G10	0,421	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle positivo	0,600	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,269 ± 0,0025		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,274			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).

2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

ANEXO 2 (continuação)

Prova cruzada entre soro de gestantes e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

**Experimento
11**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
G1	0,484	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
G2	0,362	negativo	Negativo	Negativo
G3	0,284	negativo	negativo	negativo
G4	0,291	negativo	negativo	negativo
G5	0,400	POSITIVO	negativo	negativo
G6	0,243	negativo	negativo	negativo
G7	0,331	negativo	negativo	negativo
G8	0,350	negativo	negativo	negativo
G9	0,295	negativo	POSITIVO	POSITIVO
G10	0,421	POSITIVO	negativo	negativo
Controle positivo	0,678	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,360 ± 0,002		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,364			

**Experimento
12**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
G1	0,271	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
G2	0,212	negativo	Negativo	Negativo
G3	0,148	negativo	negativo	negativo
G4	0,251	POSITIVO	negativo	negativo
G5	0,258	POSITIVO	negativo	negativo
G6	0,178	negativo	negativo	negativo
G7	0,233	negativo	negativo	negativo
G8	0,162	negativo	negativo	negativo
G9	0,197	negativo	negativo	negativo
G10	0,406	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle positivo	0,556	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,205 ± 0,017		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,239			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).

2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

ANEXO 2 (continuação)

Prova cruzada entre soro de gestantes e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

Experimento 13	Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
		D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
				Interpretação	Interpretação
	G1	0,502	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	G2	0,388	POSITIVO	Negativo	Negativo
	G3	0,324	negativo	negativo	negativo
	G4	0,317	negativo	negativo	negativo
	G5	0,400	POSITIVO	negativo	negativo
	G6	0,239	negativo	negativo	negativo
	G7	0,311	negativo	negativo	negativo
	G8	0,307	negativo	negativo	negativo
	G9	0,300	negativo	negativo	negativo
	G10	0,442	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	Controle positivo	0,781	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	Controle negativo	0,309 ± 0,008		Negativo	Negativo
	Valor de corte	0,325			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).

2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

ANEXO 3

Prova cruzada entre soro de pacientes renais crônicos e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

**Experimento
1**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
1	0,272	Negativo	Negativo	Negativo
2	0,187	Negativo	Negativo	Negativo
3	0,268	Negativo	Negativo	Negativo
4	0,244	Negativo	Negativo	Negativo
5	0,157	Negativo	Negativo	Negativo
6	0,132	Negativo	Negativo	Negativo
7	0,134	Negativo	Negativo	Negativo
8	0,176	Negativo	Negativo	Negativo
9	0,162	Negativo	Negativo	Negativo
10	0,166	Negativo	Negativo	Negativo
11	0,171	Negativo	Negativo	Negativo
12	0,279	Negativo	Negativo	Negativo
13	0,285	Negativo	Negativo	Negativo
14	0,224	Negativo	Negativo	Negativo
15	0,223	Negativo	Negativo	Negativo
Controle positivo	0,658	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,255 ± 0,0175		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,290			

**Experimento
2**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
16	0,609	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
17	0,309	Negativo	Negativo	Negativo
18	0,408	Negativo	Negativo	Negativo
19	0,412	Negativo	Negativo	Negativo
20	0,389	Negativo	Negativo	POSITIVO
21	0,437	Negativo	Negativo	Negativo
22	0,402	Negativo	Negativo	Negativo
23	0,642	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
24	0,620	POSITIVO	Negativo	Negativo
25	0,412	Negativo	Negativo	Negativo
Controle positivo	0,690	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,415 ± 0,020		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,455			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).

2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

ANEXO 3 (continuação)

Prova cruzada entre soro de pacientes renais crônicos e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

**Experimento
3**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
26	0,277	Negativo	Negativo	Negativo
27	0,493	POSITIVO	Negativo	Negativo
28	0,229	Negativo	Negativo	Negativo
29	0,396	POSITIVO	Negativo	Negativo
30	0,258	Negativo	Negativo	Negativo
31	0,283	Negativo	Negativo	Negativo
32	0,272	Negativo	Negativo	Negativo
33	0,417	POSITIVO	Negativo	Negativo
34	0,294	Negativo	Negativo	Negativo
35	0,298	Negativo	Negativo	Negativo
36	0,602	POSITIVO	Negativo	Negativo
Controle positivo	0,608	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,290 ± 0,015		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,320			

**Experimento
4**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
37	0,265	Negativo	Negativo	Negativo
38	0,258	Negativo	Negativo	Negativo
39	0,159	Negativo	Negativo	Negativo
40	0,281	Negativo	Negativo	Negativo
41	0,215	Negativo	Negativo	Negativo
42	0,230	Negativo	Negativo	Negativo
43	0,189	Negativo	Negativo	Negativo
44	0,309	POSITIVO	Negativo	Negativo
45	0,251	Negativo	Negativo	Negativo
46	0,311	POSITIVO	Negativo	Negativo
Controle positivo	0,638	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,259 ± 0,012		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,283			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).
2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

ANEXO 3 (continuação)

Prova cruzada entre soro de pacientes renais crônicos e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

Experimento 5	Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
				CDC	CDC-AGH
		D.O.	Interpretação	Interpretação	Interpretação
	47	0,270	Negativo	Negativo	Negativo
	48	0,319	Negativo	Negativo	Negativo
	49	0,337	Negativo	Negativo	Negativo
	50	0,446	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	51	0,261	Negativo	Negativo	Negativo
	52	0,359	Negativo	Negativo	Negativo
	53	0,321	Negativo	Negativo	Negativo
	54	0,263	Negativo	Negativo	Negativo
	55	0,253	Negativo	Negativo	Negativo
	56	0,300	Negativo	Negativo	Negativo
	Controle positivo	0,513	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	Controle negativo	0,366 ± 0,015		Negativo	Negativo
	Valor de corte	0,396			

Experimento 6	Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
				CDC	CDC-AGH
		D.O.	Interpretação	Interpretação	Interpretação
	57	0,281	Negativo	Negativo	Negativo
	58	0,351	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	59	0,195	Negativo	Negativo	Negativo
	60	0,273	Negativo	Negativo	Negativo
	61	0,309	Negativo	Negativo	Negativo
	62	0,267	Negativo	Negativo	Negativo
	63	0,809	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
	Controle positivo	0,611		POSITIVO	POSITIVO
	Controle negativo	0,243 ± 0,035		Negativo	Negativo
	Valor de corte	0,313			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).
2- testes de microlinfocitotoxicidade : foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

ANEXO 3 (continuação)

Prova cruzada entre soro de pacientes renais crônicos e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

**Experimento
7**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
64	0,208	Negativo	Negativo	Negativo
65	0,142	Negativo	Negativo	Negativo
66	0,933	POSITIVO	Negativo	POSITIVO
67	0,490	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
68	0,199	Negativo	Negativo	Negativo
69	0,194	Negativo	Negativo	Negativo
70	0,208	Negativo	Negativo	Negativo
71	0,262	POSITIVO	Negativo	Negativo
Controle positivo	0,589		POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,186 ± 0,014		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,214			

**Experimento
8**

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
72	0,501	POSITIVO	Negativo	Negativo
73	0,259	Negativo	Negativo	Negativo
74	0,350	Negativo	Negativo	Negativo
75	0,203	Negativo	Negativo	Negativo
76	0,338	POSITIVO	Negativo	POSITIVO
77	0,258	Negativo	Negativo	Negativo
78	0,255	Negativo	Negativo	Negativo
79	0,379	POSITIVO	Negativo	Negativo
80	0,379	POSITIVO	Negativo	Negativo
Controle positivo	0,469		POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,267 ± 0,010		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,287			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).

2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

ANEXO 3 (continuação)

Prova cruzada entre soro de pacientes renais crônicos e linfócitos de diferentes doadores avaliada pelos métodos imunoenzimático e de microlinfocitotoxicidade

Experimento 9

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
81	0,297	Negativo	Negativo	Negativo
82	0,756	POSITIVO	Negativo	POSITIVO
83	0,202	Negativo	Negativo	Negativo
84	0,360	POSITIVO	Negativo	Negativo
85	0,663	POSITIVO	Negativo	Negativo
86	0,221	Negativo	Negativo	Negativo
87	0,219	Negativo	Negativo	Negativo
Controle positivo	0,572		POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,318 ± 0,01		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,338			

Experimento 10

Número de Identificação das Amostras	CELISA		MICROLINFOCITOTOXICIDADE	
	D.O.	Interpretação	CDC	CDC-AGH
			Interpretação	Interpretação
88	0,237	Negativo	Negativo	Negativo
89	0,206	Negativo	POSITIVO	POSITIVO
90	0,270	POSITIVO	Negativo	Negativo
91	0,230	Negativo	Negativo	Negativo
92	0,233	Negativo	Negativo	Negativo
93	0,217	Negativo	Negativo	Negativo
94	0,456	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
95	0,262	POSITIVO	Negativo	POSITIVO
96	0,221	Negativo	Negativo	Negativo
Controle positivo	0,421		POSITIVO	POSITIVO
Controle negativo	0,205 ± 0,0165		Negativo	Negativo
Valor de corte	0,238			

* Testes de microlinfocitotoxicidade clássico (CDC) e potencializado com antigamaglobulina humana (CDC-AGH)

** Nos 3 tipos de testes todas amostras de soros de pacientes e controles foram avaliadas diluídas 1/2. Controle Negativo: mistura de soro de 20 indivíduos normais, do sexo masculino e não transfundidos. Controle Positivo: amostra de soro de indivíduo renal crônico com 90 a 100 % de reatividade contra painel de linfócitos T, avaliado não diluído, pela técnica de CDC.

Interpretação: 1- teste CELISA: foram consideradas positivas as amostras cujas médias das triplicatas foram maiores que o valor de corte (média das D.O., obtidas em comprimento de onda de 492nm, com o controle negativo mais 2 desvios padrões).
2- testes de microlinfocitotoxicidade: foram consideradas positivas as amostras em que a percentagem de células mortas foi maior que 50%.

Anexo-04

Reatividade Contra Pannel de Linfócitos do Soro de Gestantes no primeiro Trimestre de Gestação, avaliada pelos métodos de Citotoxicidade Dependente de complemento (CDC), Potencializado pela adição de Antigamaglobulina Humana (CDC-AGH) e Imunoenzimático Celular (CELISA)

Tipagem HLA			Gestantes																				
			1			2			3			4			5			6			7		
A	B		CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA
3	24	35 44		*X		X		X			X												
2	9	45 -	X	X		X		X			X												
1	10	35 -		X	X			X															
2	-	13 38	X	X	X		X	X															
1	28	17 49		Z	X	X		X			X			X							X		
26	-	7 38	X	X		X	X	X			X										X		
2	24	7 55		X	X			X			X												
34	24	35 44	X	X				X															
2	-	45 50		X	X		X	X															
30	32	13 44		X	X			X						X									
30	3	7 13		X	X			X	X					X	X					X	X		
2	32	51 62	X	X	X		X	X	X														
28	31	44 -	X	X	X			X	X														
23	-	44 49		X	X				X														
3	68	7 62		X	X		X	X	X				X	X									
1	68	5 35			X			X	X														
11	24	27 62			X				X														
1	30	18 49	X	X	X				X	X													
3	26	38 -	X	X	X				X	X			X										
23	-	62 -	X	X																			
3	68	35 -	X	X	X			X	X														
1	2	27 8	X	X	X			X	X					X									
2	29	18 44	X	X	X				X														
1	11	53 7																					
26	11	35 7		X	X																		
-	23	18 49	X	X	X			X															
1	3	7 41		X	X																		
28	25	50 7	X	X	X				X	X													
**RCP (%)			50	89	78	11	32	14	60	78	85	0	17	7	25	60	53	21	50	57	14	57	92

*X= Indicativo de reação positiva no referente método

**RCP= Nível de Reatividade Contra Pannel de Linfócitos expressa em percentagem de positividade

Anexo-05

Reatividade Contra Pannel de Linfócitos do Soro de Pacientes Renais Crônicos Politransfundidos, avaliada pelos métodos de Citotoxicidade Dependente de complemento (CDC), Potencializado pela adição de Antígeno de Anticorpo Humano (CDC-AGH) e Imunoenzimático Celular (CELISA)

Tipagem HLA		Pacientes Renais Crônicos																							
		1			2			3			4			5			6			7			8		
		A	B	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC	CDC-AGH	CELISA	CDC
29	25	35	-		X*	X		X	X								X	X				X	X		X
1	25	44	-		X	X		X	X														X		
2	33	14	-	X	X	X	X	X	X			X											X		
29	30	45	13	X	X	X		X	X														X		
1	30	7	13		X	X		X	X														X		
3	11	5	8	X	X	X								X									X		
29	30	60	38		X	X			X								X			X			X		
2	30	5	14	X	X	X	X	X	X			X					X	X		X	X		X		
32	30	13	49		X	X			X			X					X	X		X			X		
1	9	7	37		X	X			X			X					X	X					X		
26	-	7	38	X	X	X		X	X			X					X	X		X			X		
1	23	17	49		X			X	X			X					X	X		X			X		
3	28	18	-		X	X		X	X																
2	23	44	-	X	X	X	X	X	X			X					X	X							
-	24	18	35	X	X	X		X	X			X					X	X							
24	11	18	14		X	X			X			X					X	X		X					
11	11	49	14																						
28	30	51	39	X	X			X	X			X					X	X					X		
9	32	35	44	X	X						X						X	X					X		
-	11	62	55																						
-	24	5	37	X	X	X			X			X					X	X							
34	24	35	44	X	X				X			X					X	X		X			X		
3	30	53	14		X																				
11	30	5	56		X	X			X			X								X					
11	32	35	22		X	X			X			X													
2	23	62	17	X	X	X	X	X	X			X					X	X							
9	11	7	57			X			X			X					X	X					X		
23	-	44	57	X	X	X			X			X					X	X		X			X		
**RCP (%)		46	89	67	21	57	18	39	67	39	32	42	46	21	25	28	42	60	57	39	7	0	25	75	82

*X= Indicativo de reação positiva no referente método

**RCP= Nível de Reatividade Contra Pannel de Linfócitos expressa em percentagem de positividade