



# Validação de metodologia analítica para determinação de endotoxina bacteriana em água para diálise por meio de método cromogênico cinético

## Analytical methodology validation for determining the bacterial endotoxin in the dialysis water by means of kinetic chromogenic technique

[RIALA6/1734](#)

Ellen Gameiro HILINSKI<sup>\*</sup>, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR<sup>1</sup>, Fernando Pontes de Lima e SILVA<sup>1</sup>, Terezinha de Jesus Andreoli PINTO<sup>2</sup>, Adriana BUGNO<sup>3</sup>

<sup>\*</sup>Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz. Av Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 30682963. E-mail: [ellen.hilinski@ial.sp.gov.br](mailto:ellen.hilinski@ial.sp.gov.br)

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

<sup>3</sup>Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 05.12.2017 - Aceito para publicação: 07.02.2018

### RESUMO

O nível de endotoxina presente na água tratada para hemodiálise é um importante indicador de qualidade, uma vez que altas concentrações de endotoxina atuam como a principal fonte de inflamação crônica em pacientes submetidos à diálise. Este estudo visa validar o método analítico para determinar quantitativamente a endotoxina bacteriana em amostras de água de hemodiálise pelo método cromogênico cinético e de comparar com o método de coagulação em gel. Os ensaios pelo método de coagulação em gel foram realizados de acordo com a Farmacopeia Brasileira em três amostras de água de hemodiálise. A validação do método cromogênico cinético foi realizada utilizando-se as mesmas amostras por meio de sistema de teste portátil. As médias geométricas das concentrações dos pontos finais obtidos nos testes de confirmação de sensibilidade LAL e de interferência por método de coagulação em gel apresentaram resultado de 0,125 UE/mL. Os resultados obtidos pelo método cromogênico para a recuperação do controle positivo do produto variaram de 89 a 186% e o coeficiente de variação de 2,5 a 18,2%, demonstrando que as amostras não apresentaram interferência. Foram obtidos resultados equivalentes em ambos os métodos, o que permite a implementação do método em laboratórios de saúde pública.

**Palavras-chave.** validação, endotoxina, água, diálise renal.

### ABSTRACT

The occurrence of endotoxin in the treated water for hemodialysis is an important indicator of quality, since high concentrations of endotoxin constitute the main source for causing chronic inflammation in patients undergoing dialysis. This study aims at validating the analytical method for determining quantitatively the bacterial endotoxin in hemodialysis water samples. The data from the kinetic chromogenic method were compared with the results obtained from the gel coagulation technique. The gel coagulation assays were performed in three samples of hemodialysis water, according to the Brazilian Pharmacopoeia. The validation of the kinetic chromogenic method was performed using the same samples through the portable test system. The geometric means of the concentrations of the endpoints obtained from the tests for confirming the LAL sensitivity and the interference by gel coagulation method showed a result of 0.125 EU/mL. The results obtained by the chromogenic method for recovering the product positive control varied from 89 to 186% and the coefficient of variation from 2.5 to 18.2%, demonstrating that the samples did not show interference. Equivalent results were obtained in both methods, therefore being viable the implementation of this methodology in the public health laboratories.

**Keywords.** validation, endotoxin, water, renal dialysis.

A qualidade microbiológica da água tratada para diálise está diretamente relacionada à ocorrência de infecções e de reações pirogênicas nos pacientes<sup>1</sup>. Manutenção inadequada do sistema de tratamento, distribuição da água e alterações na integridade das membranas dos dialisadores têm sido descritas como prevalentes causas de contaminação, especialmente por bactérias Gram negativas, potenciais formadoras de biofilme, que atuam como fonte permanente de bactérias e endotoxinas, aumentando o risco aos quais os pacientes estão expostos<sup>2,3</sup>. Assim, um importante indicador de qualidade da água tratada para a diálise é o nível de endotoxina, constituindo a principal fonte de inflamação crônica em pacientes submetidos ao tratamento dialítico<sup>1</sup>.

Estudos indicam que o estabelecimento de padrões rigorosos de qualidade para a água utilizada para diálise diminui a mortalidade dos pacientes sob tratamento dialítico<sup>4</sup>. Neste sentido, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu o padrão de qualidade para a água tratada para diálise, por meio da Resolução RDC N° 11/2014, com a adoção do valor limite de 0,25 unidades de endotoxina (UE) por mL para a presença de endotoxina<sup>5</sup>.

A Farmacopeia Brasileira<sup>6</sup> descreve duas técnicas com sensibilidades distintas para a realização dos ensaios de determinação de endotoxinas bacterianas: coagulação em gel, a mais comumente empregada, caracterizada por ser uma técnica semi-quantitativa baseada na formação de gel, e as técnicas fotométricas, caracterizadas por serem técnicas quantitativas baseadas no desenvolvimento de turbidez após a quebra de um substrato endógeno (método turbidimétrico) ou no desenvolvimento de cor após a quebra de um complexo peptídeo sintético cromógeno (método cromogênico)<sup>6</sup>.

A necessidade de quantificação do nível de endotoxina presente nas amostras de água tratada para diálise tem conduzido à busca estratégica de métodos alternativos que permitam a obtenção de dados exatos e precisos, com o auxílio de métodos sujeitos à menores interferências quando comparados aos métodos clássicos<sup>7,8</sup>.

O sistema de teste portátil (PTS<sup>®</sup>) é utilizado para a determinação quantitativa de endotoxinas bacterianas por meio do método cromogênico cinético.

Seu funcionamento é baseado na introdução de um cartucho acrílico com 4 canais contendo o reagente *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) e um substrato cromogênico, sendo dois canais utilizados para a avaliação do produto e os demais como controles positivos, uma vez que contém endotoxina pré-ensada na concentração de 0,69 UE/mL. Cada lote de cartucho possui um código de calibração relacionado a uma curva padrão do *log* do tempo de reação pelo *log* da concentração de endotoxina, construída na faixa de 2 *log*. Depois que a reação ocorre, a intensidade da cor é medida e a densidade óptica é comparada com a curva padrão arquivada internamente, específica para cada lote de cartucho. Nesta técnica, mede-se o tempo necessário para se atingir uma absorvância pré-determinada da mistura de reação ou a velocidade de desenvolvimento da cor<sup>9</sup>. Suas vantagens estão relacionadas à facilidade de execução do ensaio, bem como à obtenção dos resultados em aproximadamente 15 minutos<sup>9</sup>.

Este estudo teve por finalidade validar o método analítico para determinação de endotoxina bacteriana em água tratada para diálise pelo método cromogênico cinético, por meio do PTS<sup>®</sup> e comparar os resultados obtidos ao método de coagulação em gel a fim de garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade dos resultados, permitindo a implementação do ensaio nos laboratórios centrais de saúde pública (LACEN).

De forma a obter os dados para comparação entre as duas metodologias, foi realizada previamente a validação pelo método de coagulação em gel, através da execução dos ensaios de confirmação da sensibilidade do LAL e do teste de interferências no método de coagulação em gel (Inibição/Potencialização), utilizando três amostras de água tratada para diálise com resultados prévios negativos para endotoxina, na diluição 1:2 em água grau reagente LAL, seguindo as orientações descritas pela Farmacopeia Brasileira<sup>6</sup>. A formação de gel firme foi considerada como um indicativo da presença de endotoxina e o resultado, então, considerado positivo.

A sensibilidade ( $\lambda$ ) do LAL foi determinada através da preparação de uma série de diluições do padrão de endotoxina (CSE), com razão geométrica igual a 2 para obtenção das concentrações de  $\frac{1}{4}\lambda$ ,  $\frac{1}{2}\lambda$ ,  $1\lambda$ ,  $2\lambda$  e  $4\lambda$ , onde  $\lambda$  é a sensibilidade declarada do LAL em UE/mL (neste caso, 0,125 UE/mL). Foram utilizadas cinco concentrações do padrão de endotoxina (quadruplicata) e controle negativo da água grau reagente LAL (duplicata).

Após a obtenção dos resultados, procedeu-se à determinação do ponto final de gelificação, considerado o último teste da série decrescente de concentração de endotoxina padrão que formou gel, e calculou-se a média geométrica logarítmica dos pontos finais de gelificação e o *antilog* da média.

Os testes de interferências no método de coagulação em gel (Inibição/Potencialização) foram realizados em amostras sem adição de endotoxina (solução A) e em amostras com endotoxina adicionada (solução B), nas concentrações de  $\frac{1}{4}\lambda$ ,  $\frac{1}{2}\lambda$ ,  $1\lambda$  e  $2\lambda$ , em quadruplicatas, e testando também em paralelo as mesmas concentrações de endotoxina em água (solução C) e controle negativo em água grau reagente LAL (solução D) em duplicata. Após a obtenção dos resultados, procedeu-se à determinação do ponto final de gelificação e calculou-se a média geométrica logarítmica dos pontos finais de gelificação e o *antilog* da média.

Para a validação do método cromogênico cinético foi utilizado o equipamento PTS<sup>®</sup> bem como cartuchos Endosafe<sup>®</sup> (Charles River, Estados Unidos da América). Os ensaios foram realizados com as mesmas amostras avaliadas no método de coagulação em gel, na diluição 1:2 em água grau reagente LAL.

Para o método de coagulação em gel, a Farmacopeia Brasileira<sup>6</sup> estabelece que a sensibilidade declarada do lisado é válida quando o resultado da média geométrica do ponto final de gelificação estiver entre  $\frac{1}{2}\lambda$  e  $2\lambda$ . Além disso, para que o teste seja considerado válido quanto à inibição e potencialização da formação de gel, a média geométrica das concentrações de ponto final também deve estar entre  $\frac{1}{2}\lambda$  e  $2\lambda$ . Desta forma, os resultados obtidos satisfazem os critérios de aceitação, uma vez que as médias geométricas das

concentrações de ponto final dos ensaios de confirmação da sensibilidade do LAL e no teste de interferências no método de coagulação em gel (Inibição/Potencialização) foram de 0,125 UE/mL ( $\lambda$ ) para as três amostras avaliadas (diluição 1:2). Portanto, a validação pode ser considerada válida para esta diluição.

Para o método cromogênico, a porcentagem de recuperação do controle positivo do produto representa a relação entre a concentração de endotoxina do controle positivo do produto e uma concentração específica de endotoxina (0,69 UE/mL). Se o valor de porcentagem de recuperação estiver fora da faixa de 50 a 200%, significa que, na diluição avaliada, está ocorrendo interferência do produto. Para ser considerada livre de fatores interferentes sob as condições do ensaio, a porcentagem de recuperação do controle positivo do produto deve estar entre 50 e 200% da concentração conhecida de endotoxina adicionada e o coeficiente de variação (CV) de leitura entre as amostras deve ser menor que 25%.

Portanto, de acordo com os dados da , pode-se afirmar que o produto não apresenta interferência frente às condições do ensaio, uma vez que os resultados obtidos pelo método cromogênico satisfazem o critério de aceitação para recuperação do controle positivo do produto e do coeficiente de variação entre as amostras.

Verificou-se que as amostras ensaiadas apresentaram resultados equivalentes pelos dois métodos empregados frente à legislação vigente<sup>5</sup>, permitindo afirmar que o método cromogênico foi validado com êxito para a diluição 1:2 da amostra.

Deste modo, consideramos que é possível o emprego desta metodologia para a determinação quantitativa de endotoxinas bacterianas em amostras de água tratada para diálise através do método cromogênico cinético utilizando o PTS. O principal benefício em sua utilização está associado à liberação de resultados quantitativos em menor tempo, o que permitirá antecipar a tomada de decisões dos grupos de vigilância sanitária, a fim de que os pacientes renais crônicos que utilizam os serviços de diálise estejam expostos a menores riscos.

**Tabela.** Média dos resultados obtidos nos ensaios de validação do método cromogênico cinético

Amostra	Diluição da amostra	Amostra		Controle positivo do produto		
		UE/mL	CV (%)	UE/mL	CV (%)	Recuperação (%)
1	1:2	<0,10	0,0	0,646	2,5	94
2	1:2	<0,10	0,0	0,616	2,9	89
3	1:2	<0,10	0,0	1,28	18,2	186

Nota: Controle negativo da água = Negativo

## REFERÊNCIAS

1. Ferreira JAB, Nobrega HN, Vieira VV, Abrantes SMP. Diversidade genética e produção de biofilme de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada em unidades de Terapia Renal Substitutiva. *Rev Analytica* [Internet]. 2013;65:56-69. Disponível em: [https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8504/2/analytica\\_65\\_56-70.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8504/2/analytica_65_56-70.pdf)
2. Coulliette AD, Arduino MJ. Hemodialysis and water quality. *Semin Dial*. 2013;26(4):427-38. <http://doi.org/10.1111/sdi.12113>
3. Suman E, Varghese B, Joseph N, Nisha K, Kotian MS. The bacterial biofilms in dialysis water systems and the effect of the sub inhibitory concentrations of chlorine on them. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(5):849-52. <http://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5118.2956>
4. Hasegawa T, Nakai S, Masakane I, Watanabe Y, Iseki K, Tsubakihar Y et al. Dialysis fluid endotoxin level and mortality in maintenance hemodialysis: A nationwide cohort study. *Am J Kidney Dis*. 2015;65(6):899-904. <http://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.12.009>
5. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 14 mar 2014. Seção 1(50):40.
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Farmacopeia Brasileira*. 5. ed. v.1. Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume1.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf)
7. Parenteral Drug Association – PDA. Technical Report Nº 33. Evaluation, validation and implementation of alternative and rapid microbiological methods. Bethesda: Parenteral Drug Association; 2013. Disponível em: [https://store.pda.org/TableOfContents/TR3313\\_TOC.pdf](https://store.pda.org/TableOfContents/TR3313_TOC.pdf)
8. Sutton S. Validation of alternative microbiology methods for product testing. *Pharm Tech*. 2005;29(4):118-22. Disponível em: <http://www.pharmtech.com/validation-alternative-microbiology-methods-product-testing>
9. Suzuki Y, Suzuki K, Shimamori T, Tsuchiya M, Niehaus A, Lakritz J. Evaluation of a portable test system for assessing endotoxin activity in raw milk. *J Vet Med Sci*. 2016;78(1):49-53. <http://www.doi.org/10.1292/jvms.15-0370>