

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Cristiane Caldeira da Silva

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO PIROGÊNICA EM SOROS HIPERIMUNES E
AMBIENTES SUJEITOS A VIGILÂNCIA SANITÁRIA: COMPARAÇÃO DOS
MÉTODOS *IN VITRO* E *IN VIVO* APLICADOS AO CONTROLE DA QUALIDADE**

Rio de Janeiro

2015

Cristiane Caldeira da Silva

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO PIROGÊNICA EM SOROSHIPERIMUNES E
AMBIENTES SUJEITOS A VIGILÂNCIA SANITÁRIA: COMPARAÇÃO DOS
MÉTODOS *IN VITRO* E *IN VIVO* APLICADOS AO CONTROLE DA QUALIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Orientadoras: Isabella Fernandes Delgado
Aurea Maria Lages de Moraes

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Silva, Cristiane Caldeira da

Avaliação da contaminação pirogênica em soros hiperimunes e ambientes sujeitos a vigilância sanitária: comparação dos métodos *in vitro* e *in vivo* aplicados ao controle da qualidade. / Cristiane Caldeira da Silva - Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2015.

213f.,il., tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Orientadora: Isabella Fernandes Delgado e Aurea Maria Lage de Moraes

1. Monócitos. 2. Pirogênios. 3. Alternativas ao Uso de Animais. 4. Controle de Qualidade. 5. Vigilância Sanitária. I. Título

Evaluation of pyrogenic contamination on injectable products and environment subjected to public health surveillance: comparison between *in vitro* and *in vivo* methods applied for the quality control

Cristiane Caldeira da Silva

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO PIROGÊNICA EM SOROS HIPERIMUNES E
AMBIENTES SUJEITOS A VIGILÂNCIA SANITÁRIA: COMPARAÇÃO DOS
MÉTODOS *IN VITRO* E *IN VIVO* APLICADOS AO CONTROLE DA QUALIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como
requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância
Sanitária

Aprovado em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marcelo Salabert Gonzalez (Doutor)
Universidade Federal Fluminense

Wlamir Correa de Moura (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Isabella Fernandes Delgado (Doutor)- Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Aurea Maria Lages de Moraes (Doutor) - Orientadora
Instituto Oswaldo Cruz

“A ciência é o melhor instrumento
para medir nossa ignorância”

Paolo Mantegazza

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter tornado tudo possível.

A minha família, pelo amor, compreensão e encorajamento em todos os momentos da minha vida.

As minhas orientadoras Dra. Isabella Fernandes Delgado e Dra. Aurea Maria Lage de Moraes pela orientação, ensinamentos, e principalmente pela confiança no tema apresentado.

A Octavio Augusto F. Presgrave, pela colaboração na orientação deste trabalho e confiança em mim depositados contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

A João Carlos Borges Rolim de Freitas (Profeta) pela grande experiência profissional e de vida transmitida durante todos esses anos de convívio.

Aos amigos Ronald Santos Silva, Izabela Gimenes e Clarice Abreu pela força e incentivo em todos os momentos deste trabalho.

A Edmilson Souza e Adigerson Ferreira Pires da Costa pelo apoio na rotina do setor

Aos bolsistas do laboratório: Mayara, e Rafaela pelo auxílio nos testes, José Mário (in memorian), Hilton, Vanessa, Gisele, Gabrielle e Douglas pelo apoio nesta jornada.

A Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas pela colaboração como revisora desta tese.

A todos os doadores voluntários que contribuíram para este trabalho e que tornaram possível sua realização.

RESUMO

A necessidade de substituição do Teste de Pirogênio em Coelho (RPT, sigla do inglês Rabbit Pyrogen Test) no controle da qualidade de produtos injetáveis torna urgente o estabelecimento de métodos alternativos que possam substituí-lo. Devido às limitações do Teste de Endotoxina Bacteriana ou Lisado de Amebócitos do *Limulus* (LAL), o Teste de Ativação de Monócitos (MAT, sigla do inglês Monocyte Activation Test) foi implementado na Farmacopéia Européia. Entretanto, o MAT foi considerado apenas como um terceiro teste devido à falta de estudos em relação a comparação *in vivo* e *in vitro* para alguns produtos como os biológicos, assim como para pirogênios não endotoxinas. O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade do MAT para soros hiperimunes e na resposta ao Zymosan comparando em paralelo com o modelo *in vivo*, assim como uma nova aplicação para ambientes comparando com a análise microbiológica. Desta forma, foram avaliados i. o uso do sangue criopreservado em relação ao fresco por doadores individuais e no *pool* tanto na contagem de diferentes tipos celulares, assim como na resposta de IL-1 β em relação a Endotoxina, ii a aplicabilidade do MAT (IL-1 β e IL-6) para 43 lotes de soros hiperimunes, assim como lotes contaminados artificialmente, através da determinação do limite de detecção (LD), da máxima diluição válida (MVD), do teste de interferentes, e da sensibilidade, especificidade e acurácia em relação ao RPT; iii aplicabilidade do MAT (IL-1 β e IL-6) na detecção do Zymosan através da comparação em paralelo de amostras contaminadas artificialmente no RPT e no MAT, e iv aplicabilidade do MAT (IL-1 β e IL-6) na detecção de pirogênios em amostras de ar em três laboratórios e dois escritórios, comparando com o método preconizado na legislação brasileira (contagem de fungos totais). Os resultados mostraram que a contagem de linfócitos/monócitos permaneceu estável durante o tempo de congelamento (-80°C) e que o *pool* não interferiu na resposta a endotoxina. Além disso, o MAT apresentou alta sensibilidade (100%) e especificidade (87,5% para o Método A e 82,5% para o Método B), sendo mais sensível na detecção de soros hiperimunes do que o RPT. Os resultados do Zymosan seguiram a mesma tendência, onde o limite de febre encontrado no RPT foi de 5,000ng/mL e no MAT de 2,500ngmL⁻¹. Este também foi capaz de detectar pirogênios em amostras de ar, variando entre 0,16 a 5,17 EUUmL⁻¹ para IL-1 β e de 0,49 a 5,70 EUUmL⁻¹ para a IL-6 em estações frias e de 1,03 a 2,67 EUUmL⁻¹ para IL-1 β e de 1,10 a 2,67 EUUmL⁻¹ para a IL-6 em estações quentes. Os resultados apresentados demonstraram que o MAT foi capaz de detectar e quantificar contaminações pirogênicas em soros hiperimunes, assim como pirogênios não endotoxina, podendo ser utilizado na rotina do controle da qualidade para estes produtos. Desta forma, os resultados deste estudo podem indicar a inclusão do MAT na Farmacopeia

Brasileira para o controle da qualidade de soros hiperimunes, além de ser útil na tomada de decisão de órgãos internacionais em relação a substituição completa do RPT.

Palavras-chave: Teste de Ativação de Monócitos. Pirogênio. Métodos alternativos. Injetáveis. Ambiente. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

The need of replacement of animals in the Rabbit Pyrogen Test (RPT) for injectable product quality control becomes urgent the establishment of alternatives methods. Due to the limitation of Bacterian Endotoxin Test or *Limulus* Amoebocyte Lysate test (LAL), the Monocyte Activation Test (MAT) was implemented in the European Pharmacopoeia. However, the MAT was considered as a third test due the lack of studies related to *in vivo* and *in vitro* comparison for some products such biologicals, as well as, for non-endotoxin pyrogen. The aim of this study was to evaluate the applicability of MAT for hyperimmune sera and Zymosan contamination compared in parallel with the *in vivo* model, as well as, a new application for environment compared to the microbiological analysis. Thus, we evaluated i. the use of cryopreserved blood compared to fresh per individual donors and the *pool*, both in counting of different cell types, as well as, IL-1 β response; ii. applicability of MAT (IL-1 β and IL-6) on 43 batches of hyperimmune sera, as well as, contaminated batches artificially by determining the limit of detection (LD), maximal valid dilution (MVD), interfering test, and MAT sensitivity and specificity in relation to RPT; iii. applicability of MAT (IL-1 β and IL-6) for detecting Zymosan by comparing artificially contaminated samples in parallel for RPT and MAT; iv. applicability (IL-1 β and IL-6) for detecting pyrogens in air samples in three laboratories and two offices, compared with the method recommended in the Brazilian legislation (total counting of fungi). Results showed that the lymphocyte/monocytes count remained stable during freezing time (-80°C) and the *pool* did not affect the response to endotoxin. In addition, MAT showed high sensitivity (100%) and specificity (87.5% for Method A and 82.5% for Method B) being more sensitive in the detection of hyperimmune sera than the RPT. Zymosan results followed the same tendency, where the fever limit found in RPT was 5.000 ngmL⁻¹ and MAT was 2.500ngmL⁻¹. The MAT was also able to detect pyrogens in air samples, ranging from 0.16 to 5.17 EUUmL⁻¹ for IL-1 β and from 0.49 to 5.70 EUUmL⁻¹ for IL-6 in the cold season, and from 1.03 to 2.67 EUUmL⁻¹ for IL-1 β and from 1.10 to 2.67 EUUmL⁻¹ for IL-6 in warm season. Results also showed that MAT was able to detect and quantify pyrogenic contamination in hyperimmune sera, as well as non-endotoxin pyrogens, and it can be used in routine quality control for these products. Thus, the results of this study may indicate the inclusion of MAT in the Brazilian Pharmacopoeia for hyperimmune quality control, in addition to international acceptance of MAT as a complete replacement of RPT.

Key-words: Monocyte Activation Test. Pyrogen. Alternative methods. Injectable. Indoor air. Health Surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da parede celular da bactéria Gram - negativa contendo o LPS.	33
Figura 2	Principais diferenças entre as paredes de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.	35
Figura 3	Estrutura da parede celular de um fungo.	37
Figura 4	Ligação do LPS e principais estruturas envolvidas.	42
Figura 5	Funções de sinalização e localização dos TLR.	44
Figura 6	Esquema da patogênese da febre.	45
Figura 7	Criação e manutenção do <i>Limulus polyphenus</i> para a retirada da hemolinfa	50
Figura 8	Mapa da estrutura física do INCQS com os respectivos locais de coleta.	68
Figura 9	Processo de incubação dos filtros (amostras e controles positivos e negativo) com o sangue criopreservado.	76
Figura 10	Montagem dos cassetes com os filtros antes da coleta.	81
Figura 11	Número de monografias de produtos injetáveis nas Farmacopeias dos Estados Unidos (USP), Europeia (EurPh) e Brasileira (FBras) que requerem o LAL	84
Figura 12	Número de monografias de produtos injetáveis da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), Europeia (EurPh) e Brasileira (FBras) que requerem o RPT	85

Figura 13	Distribuição da contagem do número de leucócitos totais (linfócitos/monócitos e granulócitos) por tempo de congelamento.	87
Figura 14	Distribuição da contagem de agranulócitos (monócitos e linfócitos) por tempo de congelamento.	89
Figura 15	Distribuição da contagem de granulócitos por tempo de congelamento.	90
Figura 16	Comparação da resposta do sangue fresco (dia 0) e criopreservado (7-120 dias) durante o tempo de congelamento considerando-se o sangue individual e do <i>pool</i> .	91
Figura 17	Resposta de liberação de IL-1 β (a) e IL-6 (b), frente a diferentes concentrações de Zymosan no sangue criopreservado.	102
Figura 18	Média da liberação de IL-1 β no sangue total humano induzida em filtros contaminados artificialmente com LPS e amostras.	106
Figura 19	Comparação dos resultados entre a contagem de fungos (UFC m ⁻³) e atividade pirogênica (UEEm ⁻³) levando-se em consideração as variações sazonais.	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Testes <i>in vitro</i> propostos como substituição do teste em coelhos	56
Quadro 2	Esquema de incubação do sangue total humano fresco em microtubos para amostras líquidas	74
Quadro 3	Esquema de incubação do sangue total humano criopreservado em microtubos para amostras líquidas	75
Quadro 4	Esquema de incubação do sangue total criopreservado para filtros	75
Quadro 5	Preparo das concentrações de endotoxinas da curva padrão do Kit LAL Cromogênico <i>End Point</i> .	78
Quadro 6	Etapas do procedimento do Teste de Endotoxina Bacteriana.	79
Quadro 7	Principais publicações que utilizaram dados em paralelo ao RPT, MAT e/ou LAL	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Monografias que possuem testes para a detecção de pirogênios nas três farmacopeias.	84
Tabela 2	Monografias da Farmacopeia Brasileira: produtos injetáveis que requerem o RPT e LAL (<i>in vitro</i>). A área preenchida (escura) representa os testes solicitados.	86
Tabela 3	Recuperação de endotoxina (%) obtida no Teste de Interferente para soro antibotrópico no MAT utilizando sangue criopreservado e IL-1 β e IL-6 como parâmetros de leitura.	93
Tabela 4	Comparação dos resultados entre o RPT e o MAT (A e B) em relação a avaliação da contaminação pirogênica dos lotes de Soros Hiperimunes de diferentes fabricantes	94
Tabela 5	Resultados do MAT pelos Método A e B em amostras de SAB contaminadas artificialmente com endotoxina na dose limite de 5 UEmL ⁻¹	96
Tabela 6	Tabela de contingência. Comparação dos resultados do MAT/ Método A em relação ao RPT considerado como método padrão (ouro)	98
Tabela 7	Tabela de contingência. Comparação dos resultados do MAT/ Método B em relação ao RPT considerado como método padrão (ouro)	98
Tabela 8	Valores de Sensibilidade e especificidade dos Métodos A e B do MAT	99
Tabela 9	Comparação dos resultados entre o RPT e o MAT (IL-1 e IL-6) para Zymosan A. Resultados do MAT foram expressos em UEEemL ⁻¹ . NP - Não Pirogênica; P - Pirogênica; R - Repetição. Os valores da MAT são as médias de três replicatas \pm (DP).	101
Tabela 10	A Contagem de unidades formadoras de colônias de fungo presentes no ar externo e ambientes internos de acordo com diferentes estações do ano.	103

Tabela 11	Relação I/E para fungos avaliados no INCQS	105
Tabela 12	Atividade pirogênica (UEEm ⁻³) em amostras coletadas no ponto externo, e nos pontos internos, laboratórios e escritórios.	107

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

°C	Graus Celsius
a.C.	antes de Cristo
ALT	Ácido Lipoteicico
AMPc	Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	<i>activator protein 1</i> (fator ativador de proteína 1)
ASHRAE	<i>American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers</i> , (Associação Norte-Americana de Engenheiros de Aquecedores, Refrigeradores e Ar)
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
Bt	Biotério
C	Concentração do contaminante
CEC	<i>Commission of the European Communities</i> (Comissão da Comunidade Europeia)
Cecal	Centro de Criação de Animais de Laboratório
Ceua	Comissão de tica no Uso de Animais
CLC	Concentração Limite do Contaminante
Concea	Concelho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPPI	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

D.P	Desvio Padrão
DMin	Diluição Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Optica
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i> (Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Teste de Imunoabsorção Enzimática)
ESAC	<i>Ecvam's Scientific Advisory Committee</i> (Comitê científico do ECVAM)
EUA	Estados Unidos da América
EURL-Ecvam	<i>European Reference Laboratory Ecvam</i> , (laboratório de referência do ECVAM)
EurPh	<i>European Pharmacopoeia</i> , (Farmacopéia Européia)
Fab	<i>Fragment antigen binding</i> (fragmentos ligadores de antígeno)
FBras	Farmacopéia Brasileira
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Funed	Fundação Ezequiel dias
HIMA	<i>Health Industry Manufacturers Association</i> , (Associação de Fabricantes do Setor de Saúde)
HYP	<i>hyper-variable</i> (hipervariável)
IAL	Instituto Adolph Lutz
IB	Instituto Butantan

	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>
ICCVAM	(Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos Alternativos)
I/E	Interno/externo
IFN- α	Interferon – alfa
Ig	Imunoglobulina
IGHAT	Imunoglobulina Humana Antitetânica
IL- 6	Interleucina-6
IL-1 β	Interleucina-1beta
INCQS	Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
IOM	Instituto Octávio Magalhães
IRF3	<i>interferon (IFN)-regulatory factor 3</i>
IVB	Instituto Vital Brazil
JAK1/STAT3	<i>Janus-quinase/ signal transduction-activated transcription</i>
Lab	Laboratório
LAL	Lisado de Amebócitos de <i>Limulus</i>
LBP	<i>lipopolysaccharide-binding protein</i> (proteína ligante de lipopolissacarídeo)
LCCDMA	Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos
LD	Limite de Detecção
LPS	Lipopolissacarídeo

LRR	<i>Leucine-rich-repeat</i> , (repetições ricas em leucina)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (Proteíno-quinases ativadas por mitógenos)
MAT	<i>Monocyte Activation Test</i> (Teste de Ativação de Monócitos)
MD2	<i>myeloid differentiation protein-2</i> (Proteína Mielóide Diferenciadora 2)
MM6	Mono Mac 6
MVD	Máxima Diluição Válida
MyD88	<i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i> (proteína de resposta primária de diferenciação mielóide – 88)
NFkB	<i>Nuclear Factor kappa B</i> (Fator Nuclear Kappa B)
NK	Natural Killer
NP	Não pirogênico
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i> , Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Pirogênico
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados a patógenos)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
PG	Peptideoglicano
PGE ₂	Prostaglandina E ₂

PGH	Prostaglandina H
PNI	Programa Nacional de Imunização
PTFE	Politetrafluoretileno
QAI	Qualidade do Ar de Interiores
R	Repetição
RE	Resolução
RPT	<i>Rabbit Pyrogen Test</i> (Teste de Pirogênio em Coelhos)
SAAP	Soro anti-aracnídico pentavalente
SAB	Soro antibotrópico
SABC	Soro antibotrópico crotálico
SABL	Soro antibotrópico laquétrico
SABLC	Soro antibotrópico laquétrico crotálico
SABt	Soro antibotulínico
SAC	Soro anticrotálico
SAE	Soro anti-escorpiônico
SAEI	Soro anti-elapídico
SAL	Serviço de Animais de Laboratório
SALd	Soro antilatrodéctico
SALx	Soro antiloxoscélico

SAR	Soro antirrábico
SAT	Soro antitetânico
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade
Sinan	Sistema Nacional de Notificação
Sinitox	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SIH-SUS	Sistema de Internação Hospitalar-Sistema único de Saúde
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THP-1	<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i> (Linhagem monocítica humana derivada de leucemia monocítica aguda)
TI	Teste de Interferentes
TIR	<i>Intracellular Toll-Interleukin1 (IL-1) receptor</i> (receptor intracelular Toll/IL-1)
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adaptor protein</i> (proteína adaptadora contendo domínio TIR)
TLR	<i>Toll Like receptors</i> (receptores do tipo Toll)
TM	transmembrana
TNF- α	<i>Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i> (molécula adaptadora relacionada a TRIF)
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon-β</i> (adaptador contendo domínio TIR indutor de interferon β).

UE	Unidade de Endotoxina
UEE	Unidades Equivalentes de Endotoxina
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> (Farmacopeia dos Estados Unidos)
VIT	Varição Individual de Temperatura
VMR	Valor Máximo Recomendado
WB	<i>Whole Blood</i> (Sangue Total)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS INJETÁVEIS.....	28
1.2 SOROS HIPERIMUNES	29
1.3 PRINCIPAIS CONTAMINANTES PIROGÊNICOS.....	32
1.4 MECANISMO DA FEBRE.....	39
1.4.1 Citocinas: ativação e regulação da transcrição gênica.....	41
1.4.2 Ação das citocinas na Área Pré-Óptica (APO) do Hipotálamo	44
1.5 TESTE DE PIROGÊNIO <i>IN VIVO</i>	46
1.6 MÉTODOS ALTERNATIVOS AO TESTE DE PIROGÊNIO <i>IN VIVO</i>	49
1.7 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS PARA PRODUTOS INJETÁVEIS	52
1.8 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS NO CONTROLE DA QUALIDADE DO AR DE INTERIORES (QAI)	59
1.9 JUSTIFICATIVA	62
2 OBJETIVO GERAL	64
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
3 MATERIAIS, ANIMAIS E MÉTODOS	66
3.1 ESTÍMULOS PIROGÊNICOS.....	66
3.2 AMOSTRAS.....	66
3.2.1 Soros hiperimunes.....	66
3.2.2 Amostras ambientais	67
3.3 ANIMAIS.....	69
3.4 MÉTODOS.....	69
3.4.1 Levantamento das monografias.....	69

3.4.2 Teste de pirogênio <i>in vivo</i>	70
3.4.3 Teste de Ativação de Monócitos.....	71
3.4.3.1 Determinação do limite de detecção.....	71
3.4.3.2 Determinação da máxima diluição válida.....	72
3.4.3.3 Teste de Interferentes.....	72
3.4.3.4 Sangue total.....	73
3.4.3.5 Contagem das células sanguíneas e comparação entre os doadores e o <i>pool</i>	73
3.4.2.6 Preparação das amostras e incubação.....	74
3.4.2.7 Determinação de citocinas.....	76
3.4.4 Teste de Endotoxina Bacteriana.....	78
3.4.4.1 <i>Preparo da curva padrão</i>	78
3.4.4.2 Procedimento do ensaio.....	79
3.4.4.3 Cálculo da concentração de Endotoxina.....	80
3.4.5 Contagem dos Fungos Viáveis.....	80
3.4.6 Análise da atividade pirogênica.....	81
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	82
4 RESULTADOS	83
4.1 AVALIAÇÃO DAS MONOGRAFIAS QUE PRECONIZAM TESTES DE PIROGENICIDADE	83
4.2 PERFIL HEMATOLÓGICO E A RESPOSTA AO PADRÃO DE ENDOTOXINA DO SANGUE CRIOPRESERVADO EM RELAÇÃO AO SANGUE FRESCO UTILIZADO NO MAT DURANTE O PERÍODO DE CONGELAMENTO	87
4.3 APLICABILIDADE DO MAT PARA SOROS HIPERIMUNES.....	93
4.3.1 Capacidade de predição do mat para os soros hiperimunes: sensibilidade, especificidade e acurácia	97

4.4 APLICABILIDADE DO MAT NA DETECÇÃO ZYMOSAN	100
4.5 APLICABILIDADE DO MAT PARA DETECTAR PIROGÊNIOS EM AMOSTRAS DE AR DE LABORATÓRIOS E ESCRITÓRIOS DO INCQS COMPARANDO COM A ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS MESMOS AMBIENTES.	102
5 DISCUSSÃO	111
6 CONCLUSÃO	124
REFERÊNCIAS	125
ANEXO A ARTIGO ACEITO PARA PUBLICACAO.....	134
ANEXO B MANUSCRITO SUBMETIDO	149
ANEXO C MANUSCRITO SUBMETIDO.....	170
ANEXO D ARTIGO PUBLICADO.....	183
ANEXO E MANUSCRITO A SER SUBMETIDO.....	198

1 INTRODUÇÃO

O Artigo 6º, parágrafo 1º, da Lei nº 8.080/90 define Vigilância Sanitária como sendo “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” (BRASIL, 1990). A Vigilância Sanitária visa a promoção, a proteção, a recuperação e a reabilitação da saúde. Para isso, ela atua sobre diversos fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, ambiente, transportes, cargas e pessoas. Para essa atuação tão diversificada, a Vigilância Sanitária se vale de uma multidisciplinaridade que envolve diversas áreas do conhecimento técnico-científico que inclui a Química, a Farmacologia, a Engenharia civil, a Epidemiologia, a Biossegurança e a Bioética, entre outras (COSTA, ROZENFELD, 2000).

Os registros históricos de ações de controle sobre o exercício da medicina, o meio ambiente, os medicamentos e os alimentos são muito antigos, datando de cerca de 300 a.C., como exemplo, uma lei que proibia a adulteração de alimentos medicamentos e perfumes na Índia. Desde a Antiguidade até a Idade Média, foram se desenvolvendo ideias que nortearam a evolução dos conceitos até que, em 1348, as medidas estabelecidas em Veneza para impedir a entrada de epidemias nas cidades deram início à vigilância dos portos (DA SILVA, 2000).

No Brasil, a história do controle sanitário se inicia no século XVI, seguindo o modelo adotado em Portugal, onde era enfatizada a regulamentação dos ofícios de cirurgião e boticário. As medidas de higiene pública, tais como limpeza urbana, água e esgoto, controle portuário, abate de animais, comércio de alimentos, entre outros, eram de responsabilidade das Câmaras Municipais. Com a chegada da Família Real ao Brasil, em 1808, o cuidado da saúde da população foi intensificado, com a finalidade do país adquirir uma nova imagem frente à Europa (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Em 1953, através da Lei nº 1.920/53, foi criado o Ministério da Saúde. Em 1954, foi criado o Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos (LCCDM), que em 1961, passou a se chamar Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA). A partir daí, muitas regulamentações foram criadas e modificadas, até a promulgação da Lei 6.360/76, denominada a Lei de Vigilância Sanitária, que foi regulamentada através do Decreto 79.094, de 05/01/1977. Em 1981, o LCCDMA passou para a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), tendo seu nome modificado para Instituto Nacional de Controle de

Qualidade em Saúde, INCQS (COSTA; ROZENFELD, 2000). No final da década de 1990, através da Lei nº 9.782/99, foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVS), mais tarde adotando a sigla Anvisa.

A Anvisa tem por finalidade “promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à Vigilância Sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e fronteiras (BRASIL, 1999). A criação da Anvisa impôs novos desafios ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), levando o INCQS a ter um papel mais efetivo como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços (DA SILVA, 2000).

O artigo 28 do Decreto nº 4.725, de 9 de junho de 2003, que regulamenta o Estatuto da Fiocruz estabelece que “ao INCQS compete planejar, coordenar, supervisionar e executar atividades de: i. controle da qualidade de produtos para consumo humano, compreendendo alimentos, medicamentos, sangue e hemoderivados, imunobiológicos, cosméticos, saneantes, reativos para diagnósticos, equipamentos e artigos de saúde em geral; ii. estabelecimento de normas e metodologias de controle da qualidade para a rede de laboratórios do Sistema Único de Saúde (SUS); iii. capacitação de profissionais em sua área de competência para o sistema de saúde e de ciência e tecnologia do país; iv. promoção de ações regulatórias em parceria com o órgão de Vigilância Sanitária; e v. Assessoria técnica, como unidade de referência, à rede nacional de laboratórios de controle de qualidade em saúde” (BRASIL, 2003).

Assim, para o cumprimento de seu papel no âmbito do SNVS, o INCQS realiza as análises laboratoriais previstas na legislação sanitária somente para o poder público, principalmente por denúncias e por programas com instituições do SNVS. Entre as ações de Vigilância Sanitária está a realização de análises analítico-laboratoriais, que têm como objetivo principal fornecer subsídios aos órgãos competentes para elucidar dúvidas quanto a desvios dos padrões de qualidade dos produtos (INCQS, 2009).

1.1 CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS INJETÁVEIS

Soluções injetáveis são preparações destinadas à administração parenteral por vias intravenosa, intra-espinal, intramuscular, subcutânea e intradérmica. Na via intravenosa, há completa biodisponibilidade do fármaco, não havendo a etapa farmacocinética da absorção e portanto, contaminações por esta via são extremamente perigosas. Para todas as outras vias, pelo menos um endotélio vascular e, frequentemente, uma ou mais camadas de células devem ser atravessadas antes da droga alcançar a circulação. Geralmente, isto é feito através de difusão passiva e para tal, é favorável que o medicamento tenha propriedades hidrofílicas e lipofílicas (WILLIAMS, 2007)

Os primeiros registros no sentido de fazer uso da terapia parenteral iniciaram com os egípcios e suas tentativas de transfusões sanguíneas. Em 1492, ficou bem conhecida uma tentativa de transferir o sangue retirado de três rapazes ao papa Inocêncio I, terminando com a morte do Papa. A primeira transfusão sanguínea via parenteral realizada com sucesso foi feita em 1654 (RANG; DALE; RITTER, 1997).

Ainda no século XVII, iniciaram-se os procedimentos da então chamada “cirurgia infusora”, que só começou a ser utilizada de forma sistemática como terapêutica humana, em 1853, pelo médico Alexander Wood, quando administrou injeção de morfina em seus pacientes, dando origem a diversos acidentes infecciosos. Fatos como este desaceleraram o progresso da terapia de injetáveis e desencadearam uma série de discussões no meio científico comprovando a necessidade de utilização de medicamentos estéreis e de soluções aquosas com pH e tonicidade compatíveis com os tecidos onde são aplicados (WILLIAMS, 2007).

Só a partir da invenção da seringa hipodérmica no século XIX, foi renovado o interesse pelas técnicas intravenosas e, no final deste mesmo século, a administração intravenosa de soluções de cloreto de sódio e glicose tornou-se popular. Atualmente, essa via de administração de medicamentos é uma ocorrência rotineira nos hospitais, embora ainda sejam reconhecidos os perigos associados a essa prática (LOPES, 2014).

A avaliação do risco relacionada ao controle da qualidade de preparações farmacêuticas constitui um importante aspecto da Vigilância Sanitária, tendo em vista a possibilidade de se prevenir ou minimizar riscos à saúde humana e a incidência de mortes ou doenças decorrentes da interação de contaminantes com o organismo humano (AMORIM, 2003).

Assim, todos os produtos injetáveis que se encontram no mercado sob ação da Vigilância Sanitária devem ser livres de pirogênio (nome utilizado para definir qualquer substância que produza febre). Existem três testes que são preconizados no controle da qualidade de produtos injetáveis para a detecção de pirogênios: o Teste de Pirogênio em coelhos, o Teste de Endotoxina Bacteriana ou Lisado de Amebócito do *Limulus* (LAL) e o Teste de Ativação de Monócitos (MAT), sendo os dois primeiros preconizados pela Farmacopeia Brasileira (FB), Farmacopeia dos Estados Unidos da América (FA) e Farmacopeia Europeia (FE) e o MAT somente na FE. (HASIWA et al, 2013).

Medicamentos e hemoderivados somente chegam para análise nos laboratórios oficiais através de denúncias ou de programas estabelecidos com as Secretarias Municipais ou Estaduais de Saúde. Também passam por análise todos os dispositivos médicos que servirão como instrumento de administração de fluidos ou soluções, tais como: bolsas de sangue, seringas, equips, agulhas etc. No caso específico de imunobiológicos (soros hiperimunes e vacinas), as análises são realizadas lote a lote, como parte do Programa Nacional de Imunização (PNI) (FREITAS, 2008).

Cabe ao INCQS, desde 1983, a responsabilidade pela avaliação da qualidade dos soros hiperimunes mesmo antes de serem distribuídos às Secretarias de Saúde. Estas análises correspondem a cerca de 90% dos Testes de Pirogênio realizados no Instituto e a utilização de mais de 500 coelhos por ano. Dos soros analisados, os de maior quantitativo são os soros: antibotrópico (SAB), antirrábico (SAR), anticrotático (SAC) e antitetânico (SAT). Os produtos biológicos são comprados pelo Ministério da Saúde e utilizadas pelo PNI, após o envio às Secretarias de Saúde para serem distribuída(o)s aos postos de aplicação. Além das Secretarias de Saúde, somente os Serviços de Saúde das Forças Armadas recebem os soros, que podem ser encontrados nos postos de saúde e em hospitais que foram aprovados pelo Ministério da Saúde (PRESGRAVE, 2003; FREITAS, 2008).

1.2 SOROS HIPERIMUNES

No final do século XIX, a descoberta dos agentes causadores de doenças infecciosas representou um passo fundamental no avanço da medicina experimental. Houve um grande desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamento de doenças como a difteria, o tétano

e a cólera. Um dos principais aspectos deste avanço foi o desenvolvimento da soroterapia, que consiste na aplicação no paciente de um soro contendo um concentrado de anticorpos. A soroterapia tem a finalidade de combater uma doença específica no caso de moléstias infecciosas como a difteria, botulismo e raiva ou um agente tóxico específico, como venenos ou toxinas, como por exemplo a tetânica (BRASIL, 2006).

Os soros hiperimunes são produzidos no Brasil principalmente por quatro laboratórios públicos estaduais: Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI, Paraná), Fundação Ezequiel Dias (Funed, Minas Gerais), Instituto Butantan (IB, São Paulo) e Instituto Vital Brazil (IVB, Rio de Janeiro). Estes laboratórios produzem várias formulações de soros antipeçonhentos: SAB (pentavalente) - *Bothrops jararaca* 50%, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. moojeni* e *B. neuwedii*, 12,5% cada, SAC (*Crotalus durissus terrificus*), antibotrópico-crotálico ou SABC, antibotrópico-laquétrico ou SABL (*Lachesis muta*), antibotrópico-laquétrico-crotálico ou SABLc, anti-elapídico ou SAEI (*Micrurus frontalis*), antiescorpiônico ou SAE (*Tityus serrulatus*), anti-aracnídico-polivalente ou SAAp (*Tityus* spp., *Phoneutria* spp. e *Loxosceles* spp.), anti-loxoscélico ou SALx (*Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta*), anti-latrodéctico ou SALd (*Latrodectus curacaviensis*) e anti-lonômico ou SALn (*Lonomia obliqua*) (BRASIL, 2001, ARAÚJO, 2008).

Os acidentes por animais peçonhentos constituem um importante problema de saúde pública para os países em desenvolvimento, dada à incidência, a gravidade e as sequelas deixadas nos doentes. Mundialmente, existem aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, sendo cerca de 600 venenosas. Estas serpentes são mais frequentemente encontradas nas regiões tropical e equatorial, mas podem ser encontradas em todas as regiões do planeta com exceção da Antártida. No Brasil, foram descritas 326 espécies de serpentes, sendo 49 peçonhentas, 22 espécies da família Elapidae e 27 espécies da família Viperidae. A constituição dos soros antiofídicos adotados no Brasil são fragmentos F(ab')₂ (sigla do inglês, Fragment Antigen Binding) da imunoglobulina G (IgG) equina, mundialmente também são utilizadas preparações contendo fragmentos F(ab')₂ ou a molécula inteira de IgG de outros mamíferos (BRASIL, 2006; THEAKSTON, WARRELL; GRIFFITHS, 2003; ARAÚJO, 2008).

Podemos citar no Brasil pelo menos quatro sistemas de informação que tratam do registro de acidentes por animais peçonhentos: o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (Sinan), o Sistema de Internação Hospitalar (SIH-SUS) e o Sistema de Informação de Mortalidade (SIM). Cada um destes sistemas possui características próprias, foram criados para atender demandas diferentes

e, ao invés de se completarem, muitas vezes se contradizem (FREITAS, 2008). Dos quase 100.000 casos de intoxicação humana, animal, e de solicitação de informação registrada pelo SINITOX no ano de 2013, 25,66% (22.477 casos) ocorreram com animais peçonhentos. Estes índices são próximos aos casos envolvendo medicamentos (24.029 casos) que correspondem à principal causa de intoxicação humana (SINITOX, 2014). Ainda segundo dados do SINITOX (2014) os principais casos de acidentes foram com escorpiões, seguidos por aranhas e serpentes. Sendo que com exceção das serpentes, as principais notificações são de áreas urbanas, e talvez isso ocorra pela subnotificação das áreas rurais e não pelo número de casos (SINITOX, 2015).

Apesar dos soros antiofídicos serem os mais conhecidos, os soros produzidos para o tratamento de doenças como raiva, tétano, difteria e botulismo são importantes no contexto da saúde pública. O SAR e as imunoglobulinas humanas antirrábicas conferem imunidade passiva transitória, que persiste durante período curto de tempo com meia vida dos anticorpos administrados de aproximadamente 21 dias. A raiva preocupa no Brasil, não pelo número de casos notificados, mas por sua alta letalidade, de praticamente 100%. Na América do Sul, o cão ainda é o principal animal transmissor. Nos últimos anos o percentual dos casos de raiva humana transmitido por morcegos hematófagos tem aumentado no Brasil, principalmente na região amazônica, enquanto os casos de raiva de transmissão urbana por cães e gatos têm diminuído. Variantes do vírus rábico têm sido documentada(o)s nos casos de transmissão por morcegos. A transmissão do vírus da raiva resulta, na maioria das vezes, da inoculação de saliva infectada em tecido subcutâneo ou músculo através da mordida do animal ou inoculação de saliva em pele ou mucosa lesada através de arranhadura ou lambedura (BRASIL, 2011).

O SAT é utilizado na prevenção e no tratamento do tétano, e sua indicação depende do tipo e das condições do ferimento, bem como das informações relativas ao uso do próprio SAT e do número de doses da vacina contra o tétano recebido anteriormente. A imunoglobulina humana antitetânica (IGHAT) é constituída por imunoglobulinas da classe IgG que neutralizam a toxina produzida por *Clostridium tetani*, sendo obtida do plasma de doadores selecionados (pessoas submetidas recentemente à imunização ativa contra o tétano) com altos títulos no soro de anticorpos específicos (antitoxinas). Apesar dos dados publicados pelo Ministério da Saúde mostrarem que o número de casos de tétano no país caiu 44%, este tipo de contaminação é considerado grave e pode levar à morte. O número de casos de tétano acidental aumenta no período de enchentes que ajudam a disseminar a bactéria (BRASIL, 2006).

O SAD representa uma medida terapêutica importante, cuja finalidade é inativar a toxina circulante produzida pela bactéria Gram-positiva *Corynebacterium diphtheriae*, o mais

rapidamente possível e possibilitar a circulação de anticorpos. Sua administração deve ser efetuada o mais precocemente possível, pois não tem ação sobre a toxina já impregnada no tecido. Os esquemas de administração serão de acordo com a intensidade da manifestação da doença: formas leves (nasal, cutânea, amigdaliana); formas laringoamigdalianas ou mistas; ou formas graves ou tardias. O número de casos de difteria no Brasil vem decrescendo progressivamente. Em 1990, foram notificados 640 casos/100.000 habitantes, número que caiu para 58 casos/100.000 habitantes no ano de 2000 (BRASIL, 2006). Nos últimos 10 anos este número continuou reduzindo sendo que em 2013 foram registrados apenas 4 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2014).

O soro antibotulínico (SABt) voltou a ser produzido a partir de 2002 pelo Instituto Butantan, que não o produzia desde 1992. O Botulismo voltou a ser uma preocupação mundial depois de casos de bioterrorismo nos Estados Unidos, onde foi usado o antraz. Ao contrário deste, a toxina botulínica pode facilmente atingir grande número de pessoas através de fonte de abastecimento de água e pode ser adquirido comercialmente. No Brasil são raros os casos de botulismo sendo eventualmente registrados em mel silvestre (BRASIL, 2006).

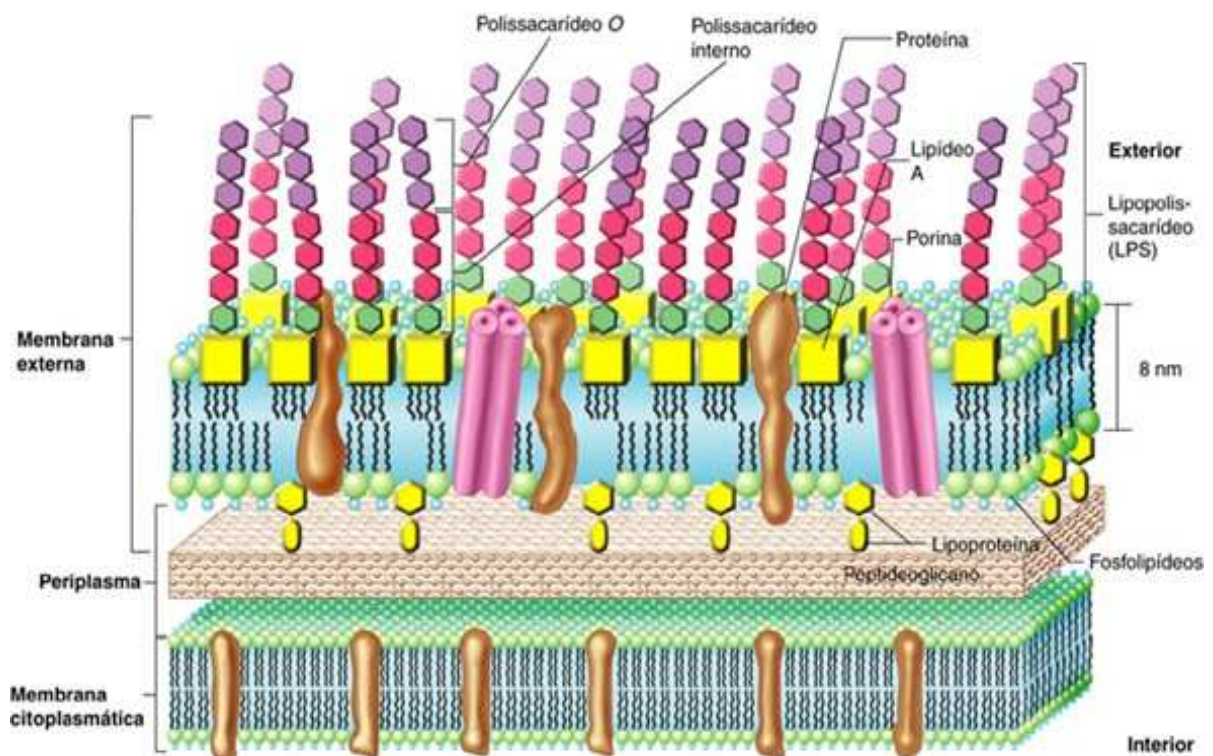
1.3 PRINCIPAIS CONTAMINANTES PIROGÊNICOS

A iniciação, manifestação e regulação da resposta febril são dependentes de propriedades pirogênicas de várias substâncias exógenas e endógenas. Os pirogênios exógenos são essencialmente microrganismos assim como seus constituintes e toxinas e os endógenos produzidos pelo próprio hospedeiro cujo principal exemplo são as citocinas (MAGALHAES et al, 2007).

A endotoxina mais estudada, também designada como lipopolissacarídeo (LPS) é responsável pela maior parte das contaminações importantes encontradas em produtos injetáveis. É um componente presente na parede celular das bactérias Gram-negativas que possuem receptores em células humanas. Podem existir endotoxinas de origem Gram-positiva, como por exemplo, as δ -endotoxinas ou proteínas Cry que são vesículas citoplasmáticas liberadas durante o processo de esporulação do *Bacillus thuringiensis*. Diferentemente das endotoxinas de origem Gram-negativa, a proteína Cry, não afeta o organismo humano e possui receptores somente em fagócitos de insetos (LIMA, 2010).

A endotoxina da parede de bactérias Gram-negativas é constituída por um núcleo polissacarídico, ao qual se liga a cadeia lateral oligossarídica e a unidade lipídica A que é parte imunogênica da molécula (**Figura 1**). Tipicamente, o lipídeo A é ligado ao núcleo pelo ácido 2-ceto-3-deoioctônico, um açúcar de 8 carbonos, exclusivo do lipopolissacarídeo bacteriano. Além da Endotoxina, a parede celular da bactéria Gram-negativa é formada por dois outros componentes externos (membrana externa e lipoproteínas) e uma camada de peptidoglicano. A camada de peptidoglicano é formada por dois açúcares aminados, o N-acetil glicosamina e o ácido N-acetil murâmico e está localizada no espaço periplasmático entre a membrana citoplasmática (interna) e a membrana externa. A camada externa possui receptores para bacteriófagos e bacteriocinas e participa da nutrição microbiana (WILLIAMS, 2007).

Figura 1 – Estrutura da parede celular da bactéria Gram-negativa contendo o LPS.



Fonte:

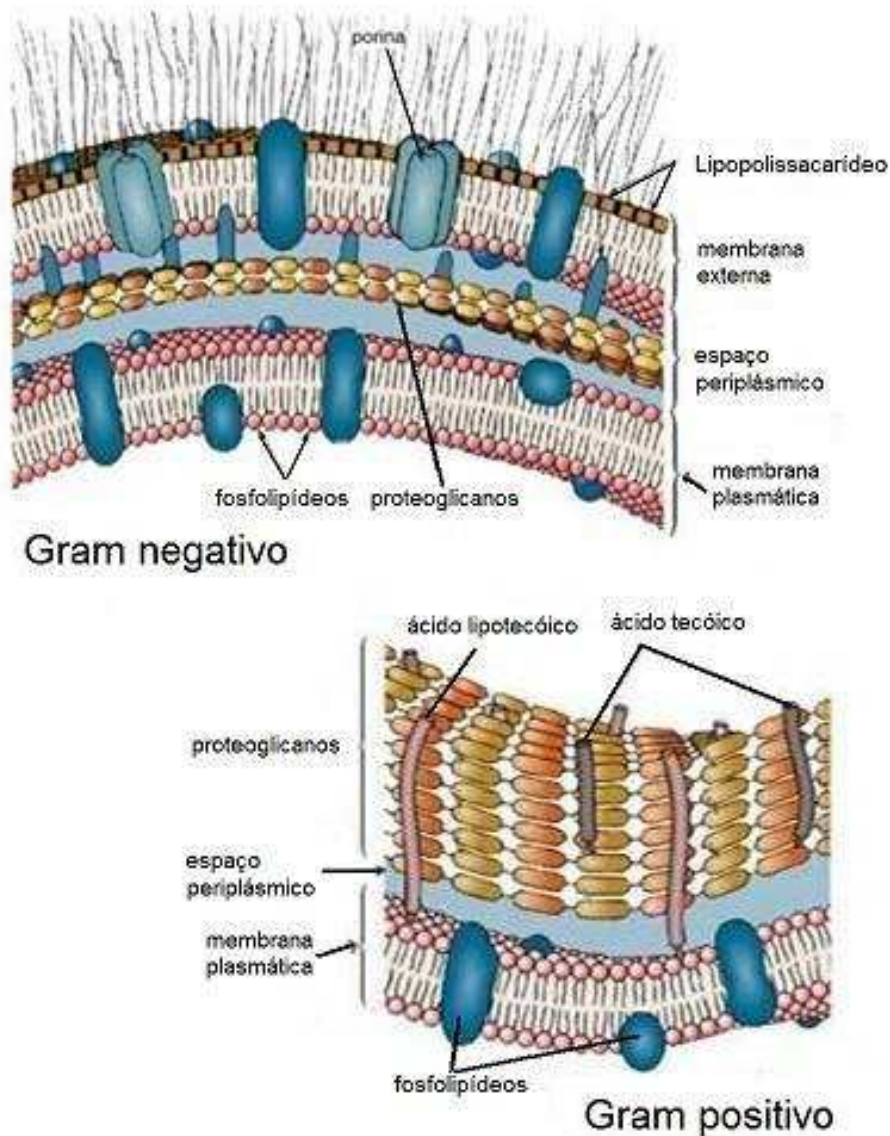
<http://alexandrecaastro.com.br/Arquivos%20NOTEBOOK/Microbiologia/Artigos%20p%20resumo/morfologia1.html>. Acessado em 23/02/2016.

Um dos fatores relacionados ao grande número de casos de contaminação por endotoxinas reside na sua natureza termo-estável que resiste aos ciclos normais de esterilização, havendo a necessidade de se proceder a sua inativação (despirogenização) através de diferentes métodos tais como, ciclos longos em calor seco em altas temperaturas (acima de 180°C), condições altamente alcalinas ou ácidas e, em alguns casos, com o uso de polimixina B. Além da pirogenicidade, a endotoxina pode, dependendo da dose apresentada, ativar o sistema de coagulação, alterar o metabolismo de carboidratos, ativar o sistema complemento, causar agregação plaquetária, liberar aminas vaso-ativas, causar choque e morte (PEARSON, 1985, WILLIAMS, 2007).

A sepse causada por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas são indistinguíveis. Entretanto, enquanto nas bactérias Gram-negativas o LPS é extensamente caracterizado, nas Gram-positivas não há uma atribuição de patogenicidade a uma estrutura específica, embora a maioria dos estudos seja direcionada ao ácido lipoteicóico (ALT) e do peptidoglicano (PGN) conforme representado na **Figura 2** (DRAINING et al, 2008). O ALT contido na parede celular destas bactérias se projeta a partir da membrana citoplasmática através das camadas de PGN. O ALT reflete cerca de 2% do peso seco de células, e 6% em mol da membrana citoplasmática e é encontrado em quase todas as bactérias Gram-positivas (além de alguns mutantes de laboratório) e por isso é muito mais comum do que o ácido teicóico, cuja produção depende das condições de cultura. A parede das bactérias Gram-positivas, onde o ALT está inserido, tem como função a manutenção da estrutura e rigidez da bactéria (SEO et al, 2008).

O ALT anfifílico da maioria dos sorotipos é geralmente composto de uma cadeia hidrófila com unidades repetitivas de glicerofosfato e D-alanina ou N-acetilglucosamina e uma parte lipofílica, composta por um glicolípido (que ancora a molécula na membrana). Um segundo tipo de ALT é a estrutura descrita para *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*, a qual possui Fosfatidilcolina, N-acetil-D-galactosamina e uma porção lipídica composta por resíduos de di- ou tri-hexodiacilglicerol, dependendo dos lipídeos disponíveis na membrana plasmática, os quais diferem entre espécies (DRAINING et al, 2008). Para iniciar a ativação celular, existe a necessidade de ligação entre o glicolípido e o ALT e as membranas celulares de células mononucleares, essa dupla ligação também pode ativar a cascata do complemento, induzindo à inflamação (DANNER et al, 1990).

Figura 2 - Principais diferenças entre as paredes de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas



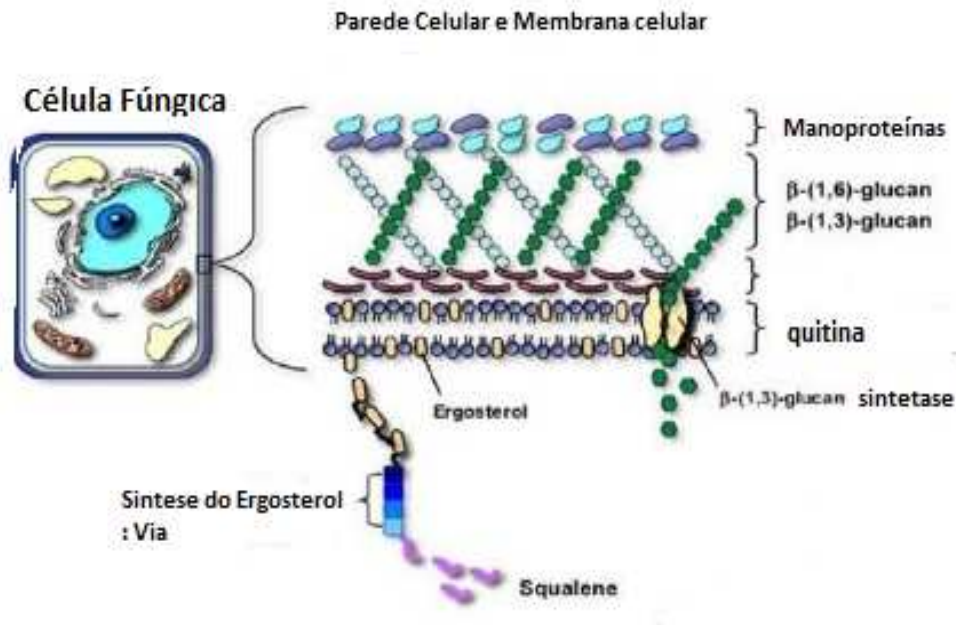
Fonte: <http://reinomonerabacteria.blogspot.com.br/2011/04/bacterias-gram-positivas-e-gram.html>
 acessado em 02/02/2015

As infecções fúngicas também são uma importante causa de morbidade e mortalidade normalmente causadas por fungos filamentosos e relacionadas com a sua presença ubíqua no ambiente, assim como sua elevada capacidade de dispersão. Quando isolados, esses fungos podem apresentar formas multiseptadas, como hifas e formas de dispersão como conídios de

tamanho pequeno, os quais contribuem para o acesso desses microrganismos aos tecidos do hospedeiro, como o trato respiratório. Na ausência de remoção adequada por macrófagos e eliminação por neutrófilos, os conídios germinam dando origem às hifas, promovendo assim a invasão de tecidos e as lesões teciduais. Os fungos filamentosos são saprófitas na sua maioria, porém em determinadas situações podem se tornar patógenos oportunistas, como exemplos *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium spp*, e *Fusarium spp*. Os fungos patogênicos também podem incluir microrganismos comensais, tais como *Candida albicans* (FIGUEIREDO; CARNEIRO; BOZZA, 2011).

A composição variável da superfície fúngica em relação à membrana celular de mamíferos oferece uma grande variedade de padrões moleculares que são importantes alvos para o reconhecimento pelo sistema imune. Desta forma, o Zymosan, um material particulado obtido a partir da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, tem sido amplamente utilizado como um modelo para a investigação dos mecanismos de reconhecimento imunológico inato contra fungos patogênicos. As partículas de Zymosan são compostas principalmente de polissacarídeos que incluem quitina, mananas e β -glicanas, além de ácidos graxos e proteínas. Entretanto seu principal componente é uma β -D-glicana ou mais especificamente (1-3)- β -glicana e (1,6)-glicana (**Figura 3**). Este é um particulado prontamente fagocitado por macrófagos e um potente indutor da liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, produzidas por macrófagos e neutrófilos (FIGUEIREDO; CARNEIRO; BOZZA, 2011).

Figura 3 - Estrutura da parede celular de um fungo.



Fonte: <http://pt.slideshare.net/VivianePorto1/polissacardeos-da-parede-celular-fngica>, acessado em 02/02/2015.

Outros importantes tipos de infecção humana são as causadas por vírus sendo os dados apresentados sobre resposta antiviral inata experimentais. Estudos apontam uma alta especificidade dependente do tipo celular envolvido no processo de reconhecimento das infecções virais mas faltam conhecimentos sobre estas inter-relações principalmente com os monócitos que são o principal tipo de célula infectada. Talvez isso ocorra pela complexidade dos genomas virais, compostos por capsídeo viral e o ácido nucleico ou ribonucleico, positivos ou negativos em polaridade, de cadeia simples ou dupla, e por vezes uma molécula circular ou com uma configuração segmentada (XAGORARI; CHLICHLIA, 2008). Um estudo conduzido por Hou e cols. (2012), demonstrou que as infecções pelo Vírus da Estomatite Vesicular, Vaccínia vírus e Influenza A (incluindo o vírus de origem suína) induziram monócitos a se dentro de 18 horas expressando CD16- CD83+, o que favoreceu a maturação de células dendríticas com uma melhor capacidade para ativar as células T. Estes resultados demonstraram que os monócitos são excepcionalmente susceptíveis à infecção viral, mas que apesar de terem maior capacidade de ativar a imunidade inata e adquirida antiviral, esta indução da maturação

das células dendríticas também pode alterar o padrão de secreção de citocinas e de expressão de receptores, resultando em prejuízo nas relações das células dendríticas com as demais células do sistema imunológico (HOU et al, 2012).

Os pirogênios endógenos são aqueles produzidos internamente pelo hospedeiro principalmente como resposta ao estímulo de pirogênios exógenos. O principal exemplo são as citocinas inflamatórias produzidas por células do sistema imune como células mononucleares (neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos) assim como células endoteliais, astrócitos e células gliais em resposta à exposição aos pirogênios exógenos (HOFFMANN, et al, 2005). As citocinas são pequenas proteínas não estruturais de peso molecular na faixa de 10-30 kilodaltons. Cada citocina é produzida por um gene separado e ativada por um sítio específico. As principais citocinas envolvidas no mecanismo da febre são Interleucina 1 β (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e o Fator de Necrose tumoral α (TNF- α). Entre as atividades destas citocinas destacam-se além da febre, a ativação (inflamação e coagulação) das células endoteliais, ativação de neutrófilos e a síntese de proteínas de fase aguda do fígado, entre outras. (DINARELLO, 2004; ABBAS, 2012).

As citocinas possuem diferentes tipos de receptores e mecanismos de sinalização. Todos os receptores consistem em uma ou mais proteínas transmembrana cujas partes extracelulares são responsáveis pela ligação às citocinas e as citoplasmáticas são responsáveis pela iniciação das vias de sinalização intracelular. A classificação mais amplamente utilizada para os receptores de citocinas baseia-se na semelhança estrutural dos domínios extracelulares e dos mecanismos de sinalização. São cinco classificações: i. receptores tipo I, ii. receptores tipo II, iii. receptores de TNF, iv. receptores de IL-1/TLR (sigla do inglês Toll like Receptor) e, v. receptores transmembrana contendo 7 alças acopladas a proteína G. A sinalização por meio de receptores de citocinas do tipo I e II ocorre por um mecanismo conhecido como sinalização JAK-STAT cujas citocinas ligantes são IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, GM-CSF e G-CSF. Já os receptores de citocinas pertencente ao TNF ativam algumas vias, entre as quais a mais importante é a via NF- κ B, assim como os receptores de IL-1/TLR (ABBAS, 2012).

A citocina IL-1 β é um importante mediador de atividade pró-inflamatória, agindo em conjunto com TNF α na resposta imune inata e adaptativa (ABBAS et al, 2012). Este polipeptídeo é sintetizado por todos os tipos celulares, e é definido como um importante regulador da atividade da resposta imunológica. A IL-1 β é a principal forma biologicamente ativa da IL-1 e normalmente é liberada após morte celular. A IL-6 foi descrita como uma

proteína multifuncional devido à sua atuação diversificada. Esta citocina apresenta um potencial regulatório sobre a imunidade inata e adaptativa sendo sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares, fibroblastos e células T ativadas. A sua produção pode ser estimulada pela presença de IL-1 β e TNF α . O mecanismo efetor deste peptídeo é a ativação da via de sinalização JAK1/STAT3 (sigla do inglês, Janus-quinase/ signal transduction-activated transcription) levando à transcrição de diversos genes que irão desencadear a síntese de proteínas de fase aguda e o estímulo à produção de linfócitos B e produção e maturação de neutrófilos. (ABBAS et al, 2012). O TNF α é considerado um dos principais mediadores da resposta inflamatória a patógenos bacterianos. A sua produção é realizada principalmente pelos fagócitos mononucleares, embora também possam ser secretadas por células T ativadas, células Natural Killer (NK) e mastócitos (ABBAS et al, 2008). O TNF α apresenta diversas ações biológicas como o estímulo ao recrutamento de neutrófilos e monócitos, através da ativação endotelial e de promover secreção de quimiocinas produzidas por macrófagos e células endoteliais. Ele atua ainda estimulando a produção de IL-1 β . (ABBAS, 2012)

1.4 MECANISMOS DA FEBRE

A febre é uma complexa reação patofisiológica resultante do contato do organismo com infecções ou agentes inflamatórios denominados de pirogênios exógenos levando a uma elevação da temperatura corpórea, acima do normal (DINARELLO et al, 1988; BICEGO et al, 2006). Entretanto, devemos distinguí-la de hipertermia. A febre ocorre quando há uma mudança no termostato hipotalâmico (*set point*), enquanto que a hipertemia é uma elevação da temperatura, sem interferência do hipotálamo, causada quando os mecanismos periféricos de dissipação do calor estão bloqueados, tanto por razões ambientais, quanto por razões fisiológicas (DINARELLO, 1988; PRESGRAVE, 2003). As principais fontes de produção de calor do corpo são as reações do metabolismo. Neurotransmissores como epinefrina e norepinefrina agem na célula aumentando a produção de energia liberada na forma de calor. Reações involuntárias como calafrios são desencadeadas por impulsos vindos do hipotálamo e toda a energia produzida é liberada na forma de calor (DINARELLO, 1988).

A perda de calor pelo organismo ocorre, em sua maior parte, sob a superfície da pele onde há diversas junções arterio-venosas, que quando abertas permitem que o sangue arterial passe diretamente para o sistema venoso, por onde o calor é dissipado para o meio externo (DINARELLO, 1988).

O estudo da febre e seus sintomas são tão antigos quanto à própria medicina, com relatos de até 2000 a.C. (HARTUNG, et al, 2001; MAGALHÃES, et al, 2007). Os estudos experimentais envolvendo reações de febre remontam a 1642, onde Ulahrendorff relatou experiências sujeitando cães a injeções venosas de vinho. Nessa época surgiu a ideia de que a febre poderia estar relacionada à administração intra-venosa de substâncias (PEARSON, 1985). Em 1822, Gaspard publicou uma revisão onde, além de relatar dados anteriores, verificou que injeções intra-venosas de diversas substâncias (leite de vaca, urina humana etc.) causavam uma elevação de temperatura menor do que a que era demonstrada com a administração de material putrefeito. Panum concluiu em 1874 que as substâncias que induziam febre eram termoestáveis, hidrossolúveis, insolúveis em álcool, diferentes de bactérias vivas e que alguns poucos miligramas eram capazes de produzir uma resposta febril. Esses achados foram confirmados por Virchow cerca de 20 anos mais tarde, quando foram publicados numa revista de maior circulação (PEARSON, 1985).

Provavelmente, Billbroth, em 1862, foi o primeiro autor a usar o termo pirogênio para designar as substâncias que causavam febre. A partir de então, muitos autores usaram esse termo em diversos trabalhos e muito foi estudado sobre o tema, mas foi Burdon-Sanderson quem mais escreveu sobre os mecanismos da febre e o primeiro a lançar, em 1876, a discussão sobre se a origem da resposta febril estava nos agentes exógenos ou em agentes endógenos liberados por células do hospedeiro (PRESGRAVE, 2003). Outro evento importante foi a descoberta do sistema de classificação de Gram, pois assim, Hort e Penfold em 1912 dividiram as bactérias Gram-negativas como sendo pirogênicas e as Gram-positivas como não-pirogênicas, quando aplicadas em coelhos, fato mais tarde descaracterizado por Co Tui (1942), que demonstrou que a resposta pirogênica não estava ligada somente a um ou outro grupo, mas se tratava de uma resposta dissociada da patogenicidade dos microrganismos (WILLIAMS, 2007). Todos esses estudos contribuíram de certa maneira para o entendimento sobre a patogênese da febre que temos hoje.

1.4.1 Citocinas: ativação e regulação da transcrição gênica

A principal forma de ativação da produção de citocinas ocorre através do contato do sistema imune inato com os pirogênios exógenos. Este reconhecimento acontece através de estruturas moleculares que são características de patógenos microbianos denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, sigla do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*). Estas estruturas incluem principalmente: i. ácido nucleicos como o RNA de fita dupla viral e as sequências de CpG não metiladas de DNA bacteriano, ii. proteínas como as iniciadas por N-formilmetiona tipicamente bacteriana, por exemplo, a flagelina, iii. lipídeos como o LPS e ácido lipoteicoico de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas respectivamente, iv. carboidratos ricos em manose e glicana como os encontrados em fungos e bactérias (ABBAS, 2012).

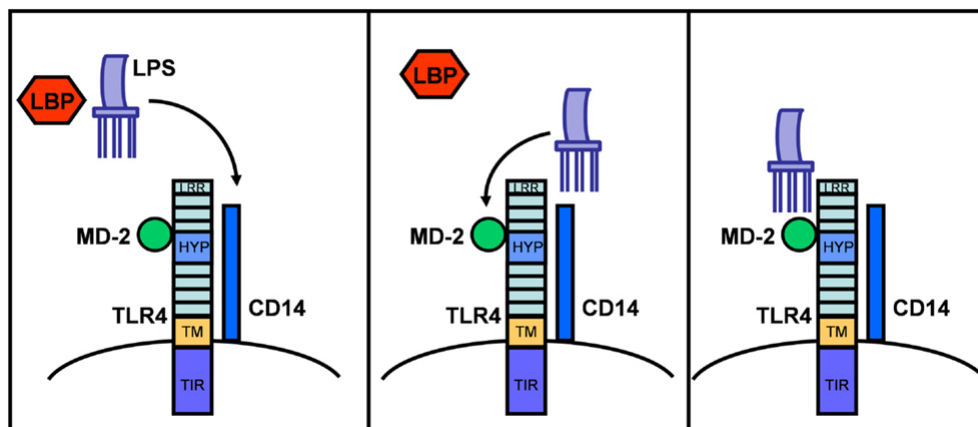
Um dos principais receptores de reconhecimento são os receptores *Toll* (TLR) que são expressos em muitos tipos celulares e reconhecem produtos de uma variedade de microrganismos. Os TLR(s) foram descobertos na década de 1990, em insetos do gênero *Drosophila*, sendo essenciais para a proteção das moscas contra as infecções fúngicas. O primeiro TLR humano foi identificado e caracterizado como um homólogo da proteína *Toll* em humanos em 1997 e partir de então tem sido identificado e classificado (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997).

Os TLR(s) são glicoproteínas integrais de membrana (tipo 1) e são encontrados tanto na superfície celular como em membranas intracelulares e, assim, são capazes de reconhecer microrganismos em diferentes localizações celulares. Os TLR(s) 1, 2, 4, 5, 6 estão presentes na membrana plasmática, enquanto que os TLR(s) 3, 7, 8, 9 e 10 estão localizados intracelularmente, ou seja, nos endossomos. São caracterizados por um domínio intracelular TIR (sigla do inglês, *Intracellular Toll-Interleukin1 receptor*) e um domínio extracelular contendo um número variado de repetições ricas em leucina, LRR (sigla do inglês Leucine-rich-repeat), que se ligam diretamente aos PAMP ou a moléculas adaptadoras que interagem com os PAMP (OGOINA, 2011, ABBAS, 2012).

O mecanismo mais estudado é a resposta de TLR-4 ao LPS (**Figura 4**), onde primeiro o LPS liga-se a proteínas ligantes de lipopolissacarídeo (LBP, sigla do inglês *lipopolysaccharide-binding protein*) no sangue ou no fluido extra-celular, e, este complexo, facilita a interação entre o LPS e a superfície celular. Estas proteínas podem estar na forma

solúvel ou ancoradas à membrana celular. Uma destas proteínas denominada proteína de diferenciação mielóide, MD2 (sigla do inglês, myeloid differentiation protein-2) liga-se ao componente lipídico A do LPS, formando um complexo que interage com TLR-4 e inicia a sinalização. Outra proteína, CD14, também é necessária a esta sinalização atuando como proteína auxiliar responsável por transferir o LPS para o receptor TLR4 ou para o complexo formado entre o receptor TLR4 e a proteína MD-2 (TAKUECHI et al, 1999; ABBAS et al, 2012). Alguns estudos mostram que apesar de TLR-2 também poder ser ativado por LPS, TLR-4 é mais sensível do que TLR-2 para LPS e é a ligação predominante em sangue humano total. No caso de preparações de LPS comerciais, a resposta inata ocorre somente via TLR4 (TAPPING et al, 2000).

Figura 4 – Ligação do LPS e principais estruturas envolvidas. TLR4 consiste de um domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR), um domínio hipervariável (HYP, sigla do inglês *hyper-variable*), um domínio transmembrana (TM), e um domínio citoplasmático, com um TIR-domínio altamente conservado. Após a ligação a LBP, o LPS é transferido para CD14 e, em seguida, para o complexo TLR4-/MD2.



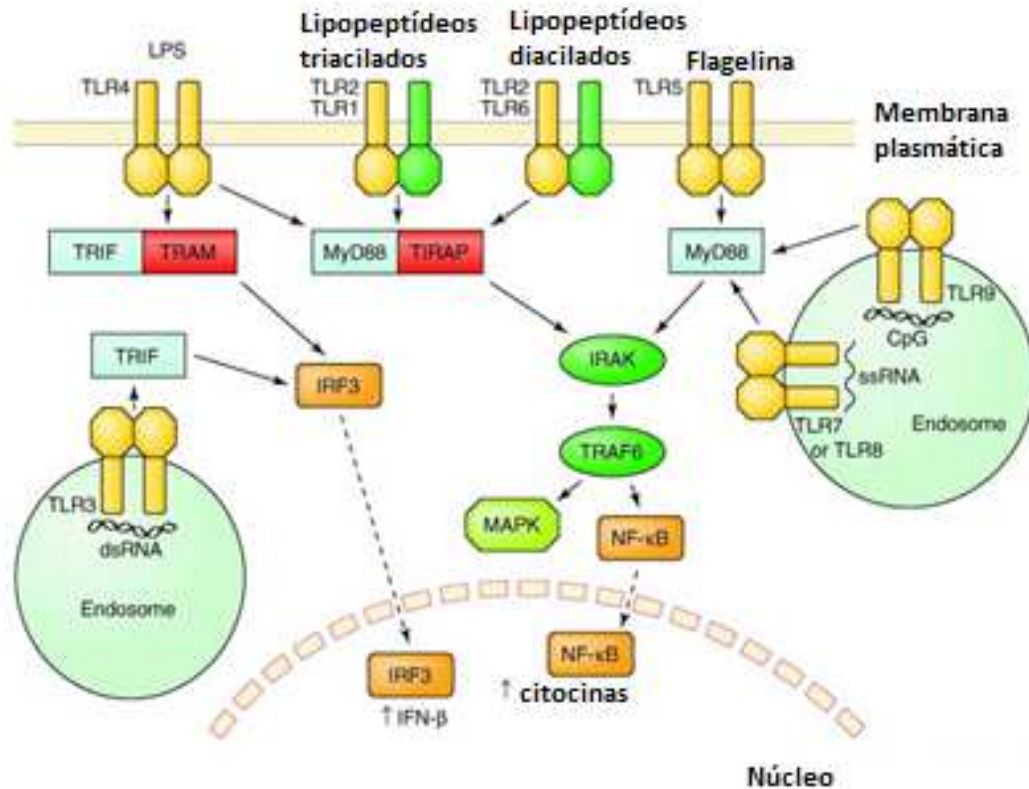
Fonte: VAURE; LIU (2014).

Os dímeros TLR-1/TLR-2 ou TLR-2 /TLR6 são responsáveis pelo reconhecimento de bactérias Gram-positivas, incluindo seus componentes como lipoproteínas, lipopeptídeos,

peptideoglicanos e o ácido lipoteicóico. TLR-2 também reconhece a proteína de fusão (F) de alguns vírus envelopados, o glicosilfosfatidilinositol de alguns parasitas, como *Trypanosoma cruzi* e o Zymosan presente nos fungos (TAKUECHI et al, 1999). O TLR-3 liga-se à fita dupla do RNA viral. O TLR-5 reconhece a proteína flagelina de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. TLR-7 e TLR-8 são responsáveis pelo reconhecimento do RNA viral de fita simples viral. O TLR-9 é responsável pelo reconhecimento do DNA bacteriano e viral (**Figura 5**). Em relação ao TLR-10, sua função permanece desconhecida (DINARELLO, 2004; ABBAS, 2012).

Várias vias de sinalização podem ser desencadeadas a partir da ligação do PAMP com os diferentes TLRs como MAPK (do inglês mitogen-activated protein kinase), AP-1 (activator protein 1), IRF3 (interferon (IFN)-regulatory factor 3), entre outras (**Figura 5**). Esta ativação ocorre através da dimerização do TLR que é induzida por ligante pela aproximação de domínios TIR intracelulares citoplasmáticos de cada proteína. A seguir, há o recrutamento deste domínio contendo proteínas adaptadoras como MyD88 (sigla do inglês *myeloid differentiation primary-response protein 88*), TIRAP (sigla do inglês, *TIR-domain-containing adaptor molecule*) e TRIF (sigla do inglês, *TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon β*), TRAM (sigla do inglês, *TRIF-related adaptor molecule*), facilitando o recrutamento e ativação de proteínas quinases, conhecidas como IRAKs (*IL-1 receptor-associated kinases*) 1, 2 e 4. A IRAK 4 é recrutada primeiramente, torna-se ativa e fosforila a IRAK 1 (AKIRA; TAKEDA, 2004). Estas quinases interagem com a MyD88 através do domínio TIR comum a ambas as proteínas, promovendo então a ativação da TRAF6 (Tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 6). Isso vai ativar quinases situadas na sequência do processo de sinalização, incluindo as I κ B (*Inhibitor of NF- κ B kinase*) resultando na liberação de NF- κ B que se transloca para o núcleo e vai aumentar a expressão gênica de citocinas inflamatórias determinando, por fim, uma resposta próinflamatória. Dependendo de qual molécula de adaptação esteja envolvida, o processo de resposta dos TLRs pode ser dividido em duas categorias: i. de resposta precoce dependente de MyD88 onde estão envolvidos MyD88 e TIRAP, vitais para a ativação de NF- κ B pelo TLR2 e TLR4, e ii. de resposta tardia que independe de MyD88 e tem envolvimento de TRAM e TRIF, sendo este utilizado pelo TLR3 na indução da síntese de IFN (SATO, et al, 2003).

Figura 5 - Funções de sinalização e localização dos TLR.



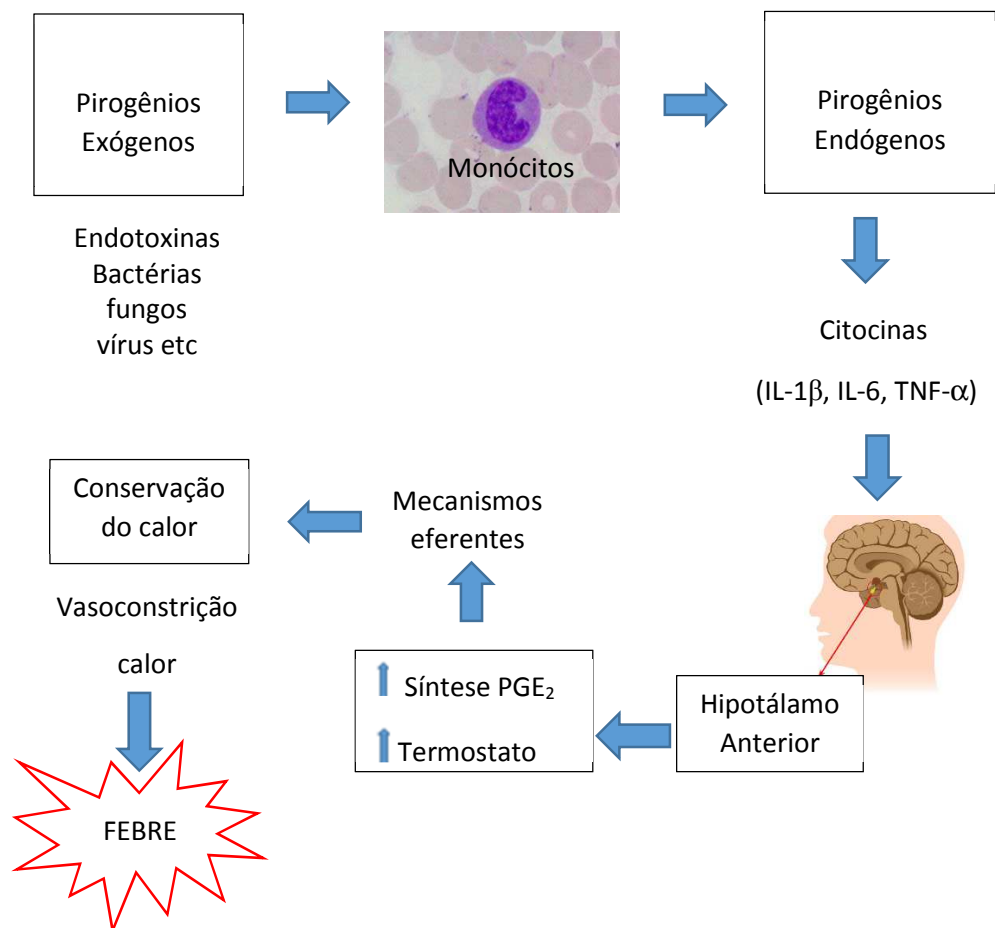
Fonte: VAN DUIND; MEDZHITOV, R SHAWEMAIL, A. C., 2006. TLR2 (em combinação com TLR1 ou TLR6) e TLR4 utilizando MyD88 e TIRAP como adaptadores primários para ativar NF-κB e secreção de citocinas inflamatórias. Além disso, TLR4 usa TRIF e a molécula adaptadora TRIF relacionada (TRAM) para ativar IRF3 e a via metabólica do IFN. TLR 3, 7, 8 e 9, localizam-se nos endossomos e ativam IFN. TLR3 utiliza TRIF, mas não TRAM, para ativar IRF3. TLR 7, 8 e 9 iniciam a secreção de citocinas e a via de IFN por meio de MyD88. Exceto por MyD88, os intermediários de sinalização utilizados por TLR 7, 8 e 9 continuam indefinidos para ativar as respostas IFN.

1.4.2 Ação das citocinas na Área Pré-Óptica (APO) do Hipotálamo

As citocinas induzem a febre principalmente através da síntese e liberação de prostaglandina. A principal é a PGE₂, uma pequena molécula de origem lipídica, derivada do metabolismo do ácido araquidônico, o qual é formado a partir da clivagem de fosfolipídios de membrana pela ação da enzima fosfolipase A₂. O ácido araquidônico é convertido a PGG₂ e,

posteriormente, a PGH_2 via ciclização e oxidação pelas ciclo-oxigenases e subsequente peroxidação pelas hidroxidases sendo essas duas atividades enzimáticas coexistentes em uma única proteína, denominada PGH sintetase. A PGH formada é facilmente transformada em PGE_2 pela ação da enzima PGE_2 isomerase (DINARELLO, 2004). A PGE_2 facilmente atravessa a barreira hematoencefálica e atua ligando-se a receptores específicos (EP_3) ativando neurônios termorreguladores da APO do hipotálamo através da liberação de AMP (AMPc). Este processo (**Figura 6**) desencadeia mecanismos de produção e conservação de calor, resultando na febre (DINARELLO et al, 1988, OGOINA, 2011).

Figura 6 - Esquema da patogênese da febre.



Fonte: Adaptado de PRESGRAVE, 2003.

Cabe ressaltar, que apesar dos pirogênios exógenos estimularem as células de defesa do organismo pro os dados apresentados sobre resposta anti viral inata são experimentais, ntamente, tem sido descrito que moléculas como o LPS também podem promover a regulação da expressão gênica no sistema nervoso central (CRUZ-MACHADO, 2010). Experimentalmente, essa resposta surge minutos após injeção sistêmica de LPS, mesmo quando citocinas ainda não são detectadas na circulação. Além disso, é bem conhecido que áreas do cérebro expressam os receptores TLR4 e CD14, como os órgãos circunventriculares (LAFLAMME; RIVEST, 2001). Nestas áreas, a comunicação do tecido nervoso com o sistema vascular é mais acessível, o que permite a passagem de moléculas que não atingem outras áreas do cérebro, desta forma o LPS promove a transcrição de genes de citocinas como TNF, IL-6 e IL-1 (DINARELLO, 2004, DUVERNOY; RISOLD, 2007). Em relação à funcionalidade dessa produção central de citocinas desencadeada pelo LPS as hipóteses principais sugerem que este processo possa modular a excitabilidade neuronal, e processos de neurodegeneração e/ou neuroproteção (RIVEST, 2003, CRUZ-MACHADO, 2010).

A sinalização do aumento da temperatura corporal (hipertermia) também pode chegar ao sistema nervoso central pelas vias aferentes vagais subdiafragmáticas, que fazem sinapse no Núcleo do Trato Solitário, de onde projeções que trafegam pelo feixe noradrenérgico ventral atingem a APO. Entretanto, alguns estudos demonstram, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, que a administração de pirogênios exógenos e endógenos causa uma rápida ativação do terminal noroadrenérgico na APO, assim como a noroepinefrina também atua na liberação de mediadores e PGE₂. Outro estudo demonstrou que o locus coeruleus possui um importante papel no desenvolvimento da febre, já que contém o maior núcleo noroadrenérgico do cérebro, onde vias ativadas por pirogênios e não a sinalização pelos sinais aferentes, causa o aumento de temperatura (BICEGO; BARROS; BRANCO, 2006).

1.5 TESTE DE PIROGÊNIO *IN VIVO*

O ensaio de pirogênio em coelhos foi descrito por Hort e Penfold em 1912, tendo como base o mecanismo da febre. Entretanto, o termo pirogênio ficou mais frequente após ser utilizado por Florence Seibert, sendo muitas vezes erradamente atribuído a ele. Seibert realizou

uma série de estudos clássicos, que comprovaram que a “febre de injeção”, estava associada à terapêutica intravenosa de produto bacteriano filtrado (MAGALHÃES; et al, 2007).

O maior impulso no conhecimento sobre pirogênios ocorreu entre 1925 e 1945. Ainda na década de 1930, soluções de dextrose e Cloreto de Sódio 0,9% (parenterais de grande volume) foram pela primeira vez avaliadas nas indústrias quanto à presença de pirogênio. A grande vantagem anunciada para estes produtos era a exigência no rótulo da ausência de pirogênio. A afirmação de ausência de pirogênio era resultado das análises realizadas nos lotes dos produtos acabados pelo controle da qualidade, baseado no teste em coelhos (WILLIAMS, 2007).

Em 1942, Co Tui demonstrou que a resposta pirogênica não estava ligada somente a bactérias Gram-negativas, mas se tratava de uma resposta dissociada da patogenicidade dos microrganismos. Nesta época, várias espécies foram testadas para a resposta febril quando se injetava pirogênio bacteriano. Macacos, cavalos, cães e gatos, assim como os coelhos reproduziram uma resposta similar à do homem. Em outros animais como ratos, cobaias, camundongos, hamsters e galinhas a resposta ao pirogênio foi irregular, prejudicando a interpretação dos resultados. Por razão de conveniência e economia, o cão e o coelho foram os animais escolhidos como modelo para estudos de pirogênio. Co Tui por sua grande experiência com cães e coelhos, relatou vantagens e desvantagens de ambas as espécies na realização do ensaio de pirogênio e concluiu que o coelho era o melhor animal para o teste de ausência de pirogênio e o cão responderia melhor a presença de pirogênio. Desta forma, o coelho tornou-se o animal modelo para o ensaio de pirogênio (WILLIAMS, 2007; MELANDRI, et al, 2010).

Com a II Guerra Mundial surgiu uma grande demanda na terapia de parenterais de grande volume, o que atraiu a necessidade de garantir um ensaio para ausência de pirogênio em preparação intravenosa no compêndio oficial da Farmacopeia Americana. Assim, em 1941, o Comitê de Revisão da Farmacopeia Americana autorizou o Subcomitê 3 em Ensaio Biológicos a iniciar o primeiro estudo colaborativo para o Ensaio de Pirogênio sob a direção de Henry Welch. Os resultados destes estudos foram publicados em 1943 (PRESGRAVE, 2003; WILLIAMS, 2007).

O primeiro método oficial para detecção de pirogênio foi incorporado à décima segunda edição da Farmacopeia Americana sendo utilizado na sua forma original até recentemente. Apenas em 2001, esta farmacopeia modificou os critérios de conformidade do teste, tornando-os mais rigorosos, considerando como febre a variação individual de temperatura igual ou superior a 0,5°C, substituindo o critério anterior de igual ou superior a 0,6°C. Em 2003, a

Farmacopeia Brasileira mudou o seu critério também, no fascículo 5º da 4ª edição (MELANDRI, et al, 2010).

O teste de pirogênio em coelho (RPT, sigla do inglês *Rabbit Pyrogen Test*) fundamenta-se na medida do aumento de temperatura corporal de coelhos, após injeção intravenosa da solução em análise, onde se toma a temperatura retal dos animais a intervalos de 30 minutos, por um período de 3 horas (HARTUNG, et al, 2001; MELANDRI, et al, 2010). É um ensaio que pode aprovar ou rejeitar uma amostra sendo utilizado para produtos que podem ser tolerados por coelhos em doses que não excedam 10 mL/kg de peso corporal, quando administrado dentro do período não superior a 10 minutos. Para produtos que necessitem preparação preliminar ou diluições apropriadas, estas condições são estabelecidas nas monografias das farmacopeias (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A resposta pirogênica em coelhos tem uma característica bem marcante, pois se inicia cerca de 45 minutos após a injeção intravenosa, atingindo o seu pico na faixa de 60 a 90 minutos, iniciando uma descida ao nível basal (perfil monofásico) (WILLIAMS, 2007). Cabe ressaltar que os coelhos respondem à mesma concentração limite que o homem, ou seja, 1 ng kg^{-1} , o que equivale a 5 UE kg^{-1} de *Escherichia coli* (HOCHSTEIN, 1990). A HIMA (*Health Industry Manufacturers Association*) nos Estados Unidos escolheu *E. coli* O55:B5 como padrão de referência de endotoxina, após conduzir um estudo colaborativo entre os laboratórios que realizavam teste de pirogênio nos Estados Unidos. O estudo estabeleceu com 95% de confiança que uma média de 50% de resultados “passa ou não passa” ocorre em concentrações acima de 98 pg mL^{-1} (aproximadamente $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$). Assim, a HIMA recomendou estabelecer $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ de endotoxina como um padrão de referência que corresponde $0,5 \text{ UE mL}^{-1}$ (PEARSON, 1985)

No Brasil, dos laboratórios oficiais que compõem o SNVS, somente o Instituto Octávio Magalhães (IOM), o Instituto Adolfo Lutz (IAL) e o INCQS realizam o RPT. Este último utiliza, anualmente, cerca de 1.200 coelhos para o controle da qualidade de soros, vacinas, hemoderivados, dispositivos médicos e parenterais de grande volume. Além disso, por ser um teste de segurança preconizado na Farmacopeia Brasileira é realizado como rotina nas etapas dos processos de produção assim como no produto final em várias indústrias (PRESGRAVE, 2003).

Estima-se que, no mundo, um grande número de coelhos seja utilizado para todos os fins de investigação e análise e, embora o número de animais usados especificamente para o RPT não tenha sido relatado, é provável que este número seja significativamente alto, incluindo dados reportados no Canadá e no Reino Unido. Em 2002, um total de 243.838 coelhos foram

utilizados nos Estados Unidos e 313.000 coelhos na União Europeia, sendo que, desses, cerca de 276.000 animais foram utilizados para produtos farmacêuticos e dispositivos médicos (investigação e de segurança). O sexto relatório da Comissão Europeia (2010) indica que roedores e coelhos representam 80% dos animais utilizados em experimentos científicos. Além do grande número de animais utilizado nos testes de pirogenicidade, estudos demonstram que apesar de ser classificado como de grau leve, também impõe ao animal dor momentânea e angústia, induzida pela resposta febril e com ela todos os sintomas associados (PRESGRAVE, 2013; COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2010).

1.6 MÉTODOS ALTERNATIVOS AO TESTE DE PIROGÊNIO *IN VIVO*

Nos últimos anos, as campanhas contra a utilização de animais de laboratório têm obtido muito espaço na mídia da mesma forma que tem crescido o número de grupos anti-viviseccionistas e, com eles, as pressões para a não realização de experimentos em animais (HARTUNG, et al, 2001).

Com a publicação do livro *The Principles of Humane Experimental Technique* por Russel e Burch, em 1959, foi introduzido o conceito dos 3Rs (*Reduction, Refinement and Replacemen*) no meio científico, que consiste na redução do número de animais, no refinamento das técnicas experimentais minimizando o sofrimento do animal e preservando o seu bem estar, e quando possível a substituição dos testes realizados *in vivo* por testes *in vitro*. Este conceito evoluiu como uma tendência mundial, iniciando uma forte pressão com implicações éticas quanto a não utilização ou diminuição do número de animais em pesquisas científicas (HARTUNG, et al, 2001; PRESGRAVE, 2003).

Desde a década de 1960, um grande esforço vem sendo realizado na busca por métodos alternativos ao teste de pirogênio (HARTUNG et al, 2001). Em 1964, Levin e Bang verificaram que preparações de endotoxina termoestáveis isoladas de *E. coli* induziam a coagulação extracelular da hemolinfa (sangue) do caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*). Posteriormente, foi desenvolvido um ensaio sensível para endotoxina em plasma humano baseado no mecanismo de defesa do artrópode (**Figura 7**), utilizando como material o lisado dos amebócitos de *Limulus* (MAGALHÃES et al, 2007).

Figura 7 – Criação e Manutenção do *Limulus polyphenus* para a retirada da hemolinfa. (a) *Limulus* em praia da costa leste dos Estados Unidos, (b) e (c) lavagem dos animais, (d) e (e) extração da hemolinfa



(a)



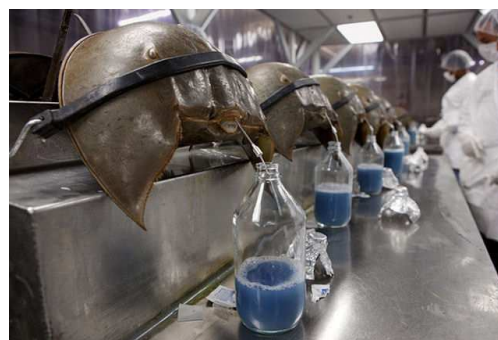
(b)



(c)



(d)



(e)

Fonte: Fukumori, 2008.

O ensaio de LAL foi pela primeira vez introduzido na Farmacopeia Americana em 1980. No Brasil, foi incluído na 4ª edição da Farmacopeia em 1996 (PINTO; KANEKO; OHARA,

2003). Apesar de incontestavelmente apropriado para determinados produtos, como radiofármacos, sua ineficiência em detectar outros tipos de pirogênicos que não sejam de origem Gram-negativa, impede uma completa substituição do RPT (HARTUNG, et al, 2001; POOLE, et al, 1988; HOFFMANN, et al, 2005). Outro problema reside na capacidade da endotoxina de se ligar às proteínas plasmáticas e não ser normalmente detectada no LAL, já que este somente quantifica endotoxina livre limitando o seu uso para determinados produtos principalmente imunobiológicos (SCHINDLER, et al, 2009).

Laude-Sharp e cols. (1990) demonstraram que o LAL, no caso de LPS de baixo peso molecular, requer uma forma agregada para ser detectado. Além disso, indica que as espécies biologicamente ativas de LPS podem atravessar as membranas de diálise *in vivo*, apesar de nenhum LPS ser detectado no sangue. Os autores concluíram que o ensaio de LAL é um critério insuficiente para comprovar a ausência de LPS em fluidos biológicos.

Segundo Brandenburg e cols. (2009), “há sérias restrições em relação à utilização do LAL na terapia antibacteriana”. Segundo os mesmos autores, “alguns ensaios clínicos, como a presença de bacteremia, não foram correlacionados ao LAL em casos de contaminação por bactérias Gram-negativas”. Também se constatou que a atividade do LAL não apresentou correlação com a expressão das citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) em células mononucleares (BRANDENBURG et al, 2009). Existem diversos métodos de LAL, entretanto, os mais utilizados são o de gelificação e o cromogênico. No primeiro caso, volumes iguais do reagente LAL e da solução a ser analisada são homogeneizados e incubados em banho-maria a 37°C por uma hora (FUKUMORI, 2008). A presença do gel que se mantém sólido durante a inversão é considerada positiva para endotoxinas. Neste método, obtém-se, somente, uma medida semi-quantitativa, uma vez que o resultado é expresso em faixas (PRESGRAVE, 2003, MAGALHAES, et al, 2007). No LAL cromogênico (LALc), um substrato cromóforo é incorporado ao complexo endotoxina-LAL resultando em reação de cor, diretamente proporcional à quantidade de endotoxina (FUKUMORI, 2008). Esse método permite uma quantificação precisa da endotoxina presente na solução testada. Existem outros métodos semi-quantitativos descritos na Farmacopeia, entre eles, o turbimétrico e o colorimétrico de proteína (MAGALHAES, et al, 2007, MELANDRI, et al. 2010).

Apesar de ser considerado um método alternativo, o LAL tem sido alvo de críticas de associações e sociedades protetoras de animais. Nos EUA, os caranguejos são geralmente devolvidos a natureza depois da retirada de cerca de 20% do seu sangue e, por conseguinte, a maioria destes animais sobrevive. No entanto, o procedimento ainda provoca uma mortalidade

de cerca de 30 mil caranguejos por ano, o que aumenta ainda mais a ameaça à população de caranguejo-ferradura, como a sua utilização como isca para a pesca, perda de habitat e à poluição (ICCVAM, 2008)

1.7 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS PARA PRODUTOS INJETÁVEIS

Muito empenho tem sido dedicado ao desenvolvimento de testes *in vitro* que possam alcançar ou superar a sensibilidade do LAL e paralelamente incorporar a detecção do amplo espectro de substâncias do RPT. Os sistemas baseados na ativação de monócitos humanos têm sido desenvolvidos desde 1988, já que apresentam como grande vantagem mimetizarem a resposta febril do organismo tomando por base o princípio do mecanismo da febre, e a quantificação de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, TNF- α) envolvidos neste processo (POOLE, et al, 1988, HARTUNG; WENDEL, 1996; HARTUNG, et al, 2001, HOFFMANN, et al, 2005, SCHINDLER, et al, 2009; DANESHIAN, et al, 2009, PERDOMO-MORALES, et al, 2011).

A primeira demonstração da aplicação da liberação de citocinas *in vitro* foi através do “teste do monócito”, em comparação com os ensaios em coelhos e LAL. Neste método, uma linhagem celular monocítica humana denominada MONOMAC-6 (MM6) foi submetida à presença de endotoxinas de diversas origens e as citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α) foram dosadas demonstrando uma boa relação dose-resposta (POOLE, et al, 1988, ZIEGLER-HEITBROCK, et al, 1988). A partir dessa publicação, alguns outros trabalhos foram desenvolvidos no sentido de melhor estudar a liberação de citocinas em diferentes cultivos de monócitos e sua relação com os ensaios em coelhos e LAL (PRESGRAVE, 2003). A utilização de células mononucleares isoladas de sangue periférico foi demonstrada como um indicador sensível de contaminação por endotoxina (POOLE, et al, 1988). Resultados promissores indicaram que, além de sensível, o método com PBMC (sigla do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) para IL-1, era capaz de detectar endotoxinas e bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) sendo considerado como um modelo substitutivo quando comparado ao LAL e ao RPT. Posteriormente, outro estudo concluiu que a liberação de IL-6 a partir de PBMC para IL-1, era capaz de detectar endotoxinas e bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus acima aparece S. aureus - padronizar*) sendo considerado como um modelo substitutivo quando

comparado ao LAL e ao RPT. Posteriormente, outro estudo concluiu que a liberação de IL-6 a partir de PBMC em soluções de hemoglobina também era um modelo sensível quando comparado ao RPT (HANSEN; CHRISTENSEN, 1990).

Taktak e cols. (1991) apresentaram um estudo que resume o desenvolvimento de um teste de pirogênio *in vitro* baseado na liberação de IL-6 a partir da linhagem celular MM6. Os autores sugerem que o método MM6/IL-6 representa uma alternativa importante e pode ser uma forma mais adequada para testar a contaminação em produtos parenterais, como a albumina de soro humano, que não pode ser detectado no LAL e no RPT nas condições experimentais avaliadas (TAKTAK, et al, 1991, ICCVAM, 2008).

Também em 1991, a Comunidade Europeia criou o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos ao Uso de Animais, o ECVAM (sigla do inglês *European Centre for Validation of Alternative Methods*), hoje, denominado UERL-ECVAM (sigla do inglês *European Reference Laboratory ECVAM*), encarregado de promover e validar técnicas e metodologias destinadas à substituição dos ensaios em animais. Uma vez validado pelo ECVAM, um método alternativo é submetido ao Comitê Consultivo Científico do Ecvam, o Esac (sigla do inglês *Ecvam's Scientific Advisory Committee*) para adoção dos métodos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, sigla do inglês *Organization for Economic Co-operation and Development*), a qual serve de base para a harmonização destas metodologias entre países signatários. Os Estados Unidos, Coreia, Brasil e Japão, também possuem centros de validação de ensaios estruturados, que harmonizam as metodologias também via OECD (ICCVAM, 2008).

Hartung e Wendel (1996) concluíram que, após estimulação do sangue total com endotoxina, bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) ou componentes desses organismos (muropeptídios, ALT, enterotoxinas e estreptolisina O) liberavam IL-1 β de forma dependente à concentração do estímulo. Com base nesses resultados, os autores sugeriram a utilização do método de ensaio WB/IL-1 β como uma alternativa para o RPT (ICVAM, 2008). Eperon e cols. (1997) desenvolveram um sistema de teste *in vitro* para a medição de substâncias pirogênicas usando dois sub- clones derivados de células MM6 (MM6-2H8 e MM6-4B5) e um de uma linhagem celular THP-1. Esses clones são relatados por serem fenotipicamente mais estáveis ao longo do tempo em relação à sua capacidade de resposta à endotoxina, do que as linhagens de origem. Os autores sugerem que esses métodos baseados em clones de células monocíticas *in vitro* são alternativas válidas para a detecção de endotoxina em preparações comerciais e

produzem resultados comparáveis ao LAL e ao teste *in vivo* (EPERON; JUNGI, 1996, HARTUNG; WENDEL, 1996, EPERON, et al, 1997).

Ainda na década de 1990, novos estudos surgiram utilizando a linhagem celular MM6 como um complemento para o LAL na detecção de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (ICCVAM, 2008). Hartung e cols. (2001) apresentaram o relatório de um workshop, patrocinado pelo ECVAM, para examinar a situação dos testes de pirogenicidade, rever a capacidade dos novos testes e apresentar recomendações para o seu desenvolvimento. A necessidade de alternativas ao teste em coelhos foi discutida e suas respectivas limitações foram destacadas. O workshop comparou a utilidade do MAT para testar contaminações pirogênicas e as conclusões indicaram a necessidade do desenvolvimento de métodos que contornassem as limitações do teste de pirogênio *in vivo*, mas destacou a necessidade da validação adequada de qualquer novo método (HARTUNG, et al, 2001, MELANDRI, et al, 2010).

Internacionalmente, novos trabalhos foram publicados com destaque para o desenvolvido por Nakagawa e cols. (2002) que descreveram um sistema baseado na liberação de citocinas a partir de um subclone de células MM6-CA8 e compararam essa resposta ao sangue total e ao teste em coelhos. Os autores sugerem que as células MM6-CA8 são capazes de detectar uma variedade de pirogênios usando IL-6 como marcador, e que estas respostas são altamente relevantes para a previsão das reações em humanos.

Andrade e cols. (2003) avaliaram a utilização de PBMCs humanos e sangue total diluído quando comparados ao LAL e ao teste em coelhos para produtos farmacêuticos e biológicos. Os autores concluíram que ambos os métodos foram comparáveis ao LAL e ao RPT na sua capacidade de detectar e quantificar a presença de endotoxina. Além disso, o método em sangue total foi capaz de detectar IL-6 independente da concentração de endotoxina e dos outros pirogênios. Ainda em 2003, foi descrito um rápido e único teste *in vitro* para a presença de substâncias pirogênicas baseado na ativação de monócitos (MM6) e liberação de IL-6 (ICVAM, 2008). Entretanto, devido à necessidade de superar algumas limitações relacionadas ao uso do sangue fresco, Schindler e cols. (2004) apresentaram um método de criopreservação no qual o sangue poderia ser usado imediatamente após o descongelamento, sem etapas de lavagem. A criopreservação torna o ensaio mais seguro em relação às questões de biossegurança, já que possibilita em tempo hábil, testar possíveis contaminações de agentes infecciosos consequentemente aumentando a confiabilidade da resposta dos monócitos, além de facilitar o transporte e armazenamento das amostras (SCHINDLER, et al, 2004)

Qualquer metodologia, *in vivo* ou *in vitro* necessita de uma validação formal para que demonstrar que é apropriada ao seu objetivo específico. Isso faz com que o desenvolvimento e disponibilização de métodos alternativos seja relativamente lenta (hoje, estima-se um tempo ao redor de 10 anos para um estudo completo, incluindo validação e aceitação regulatória), podendo alcançar cifras em torno de 300.000 Euros por ensaio (PRESGRAVE, 2009). Hoffmann e cols. (2005) publicaram um estudo de validação usando nove drogas e seis testes *in vitro* realizados em dez laboratórios. Os testes validados foram: PBMC/IL-6; WB/IL-1 β , WB/IL-6, MM6 IL-6, THP-Neo/TNF α e THP/TNF α . Comparado com o teste em coelhos, os novos testes são mais sensíveis, bem como de menor custo e prazo. Em contraste com o LAL, todos os testes foram capazes de detectar pirogênios de origem Gram-positiva. O processo de validação mostrou que pelo menos quatro dos seis testes, com exceção da linhagem THP, atendem aos critérios de qualidade para detecção de pirogênio. Segundo os autores, os resultados sugerem que a experimentação animal pode ser totalmente substituída por estes testes *in vitro*, destacando seu potencial na segurança e controle da qualidade de produtos injetáveis. O processo de validação formal, ou seja, a avaliação da relevância e da confiabilidade desses métodos foi desenvolvido pelo ECVAM (HOFFMANN, et al, 2005).

Após o processo de validação do sangue fresco, o uso do teste com sangue criopreservado foi validado “por captura” (tradução livre do inglês *Catch-up Validation*) por meio de um método simples de congelamento do sangue humano para a dosagem de IL-1 β (SCHINDLER et al, 2006), sendo incorporado aos quatro testes já validados anteriormente. Neste processo, o sangue fresco é misturado a uma solução contendo Dimetilsulfóxido (DMSO) e Tampão Sörensen e congelado a uma temperatura de -80°C por até 4 meses (SCHINDLER, et al, 2006; PRESGRAVE, et al, 2009; DANESHIAN, et al, 2009; SCHINDLER, et al, 2009). Desta forma, levando-se em consideração que a metodologia em si não era diferente, não existia a necessidade de passar por todo o processo e sim, demonstrar que o sangue criopreservado apresentava os mesmos resultados obtidos com o sangue fresco utilizado no método original. Portanto, a validação por captura pode ser entendida como um estudo no qual os critérios estruturais e de execução são comparados com aqueles de um método similar, o qual já passou por validação formal e foi aceito como cientificamente validado (PRESGRAVE, 2009).

A validação do uso do sangue criopreservado contornou uma desvantagem do MAT em relação a necessidade de doadores a cada ensaio. Pode ser usado o sangue de 4-10 doadores, sendo que a monografia farmacopeica recomenda o uso do *pool* para minimizar possíveis variações interindividuais entre os sangues dos doadores (SCHINDLER, et al, 2006,

EUROPEAN PHARMAOPOEIA, 2010). Entretanto, existem poucos estudos que demonstrem o efeito da criopreservação nos monócitos, tanto no *pool* quanto no sangue por doador, durante o período de congelamento (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O ECVAM então apresentou ao Comitê Coordenador Interagências para Validação de Métodos Alternativos, o ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), a avaliação do status de validação dos cinco métodos alternativos *in vitro* (ICCVAM, 2008; SCHINDLER, et al, 2009). Os métodos avaliados foram: Sangue total humano (WB)/Interleucina IL-1 β ; Sangue total humano WB/IL-1 β : com aplicação do sangue criopreservado, Sangue total humano WB/Interleucina (IL)-6, células Mononucleares do sangue periférico (PBMC)/IL-6 e a linhagem celular Mono Mac 6 (MM6)/IL-6 apresentados no **Quadro 1** (ICCVAM, 2008).

Quadro 1 – Testes *in vitro* propostos como substituição do teste em coelhos

TESTE	SISTEMA	DESFECHO
WB/IL 1 β	WB (Whole Blood) Sangue total humano	Dosagem de Interleucina 1 β
Cryo WB/IL-1 β	Cryo/WB (Cryopreserved Whole Blood) Sangue total humano criopreservado	Dosagem de Interleucina 1 β
WB/IL 1 β	WB Sangue total humano	Dosagem de Interleucina 6
PBMC/IL-6	PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)Células Mononucleares do sangue periférico	Dosagem de Interleucina 6
MM6/IL-6	Linhagem celular monocítica Monomac6	Dosagem de Interleucina 6

O Esac endossou a validade destes métodos, entretanto restringiu a substituição para a avaliação de endotoxinas e aceitou sua utilização para decisões de regulação, sujeitas à validação para cada produto específico. Ambos, ICCVAM e Esac concluíram que o banco de dados disponíveis não suporta o uso dos testes para detectar todos os pirogênicos, como sugerido na apresentação original pelo ECVAM (ICCVAM, 2008).

Uma das divergências em relação ao Esac foi que o ICCVAM concluiu que o banco de dados de validação apresentado era insuficiente para apoiar uma afirmação tão definitiva, mesmo que só para endotoxinas, por não incluírem produtos biológicos ou dispositivos

médicos, além de terem sido avaliadas apenas para um número restrito de produtos farmacêuticos. O ICCVAM também questionou que os dados *in vivo* não foram gerados com as mesmas amostras utilizadas no teste *in vitro*, já que foram dados anteriores ao estudo. Também é apontada a necessidade de novos estudos comparando os dados *in vivo* com *in vitro* em paralelo de forma que comparações possam ser realizadas para endotoxinas e outros pirogênicos, assim como deve ser ampliado o número de produtos avaliados (ICCVAM, 2008).

Desta forma, o ICCVAM recomendou que, nenhum destes testes deveria ser considerado como substituto completo para o RPT. Entretanto permitiu o seu uso para cada produto específico desde que fique demonstrada a equivalência ao RPT em conformidade com a regulamentação aplicável (ICCVAM, 2008, SCHINDLER, et al, 2009). Seguindo estas recomendações, o MAT foi incorporado à Farmacopeia Europeia como um terceiro teste para endotoxina, além do coelho e do LAL (ICCVAM,2008, EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2010). Foram preconizados três métodos diferentes para o MAT o A, B e C. O método A é o método quantitativo onde os valores são expressos em unidade de endotoxina equivalente por mililitro. O Método B é qualitativo onde a amostra é comparada a um controle positivo de endotoxina e o resultado é expresso em pirogênico ou não pirogênico, dependendo se a liberação está abaixo ou acima deste controle. O método C é a comparação a um lote de referência quando os dois métodos anteriores não puderem ser aplicados (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Atualmente um dos problemas da utilização do MAT é a necessidade de se validar caso a caso com o RPT os produtos não contemplados no processo de validação, e portanto, priorizar classes de produtos mais urgentes de serem implementadas no MAT, já que o número de monografias que exigem testes de pirogenicidade nas farmacopeias é extremamente extenso. Uma complexa revisão sobre o MAT e sua aplicabilidade para produtos injetáveis, assim como sua capacidade em detectar pirogênicos não-endotoxinas foi recentemente apresentada, onde, apesar dos avanços, fica evidente a necessidade de se demonstrar a aplicabilidade do MAT para qualquer produto que não foi objeto do estudo de validação (HASIWA, et al, 2013).

Também é importante destacar que vários trabalhos têm demonstrado a aplicabilidade do MAT para produtos biológicos, o que representa uma grande vantagem sobre o LAL mesmo no caso onde este pode ser aplicado, como na avaliação de segurança de vacinas. Para a produção da vacina de diferentes cepas de *Neisseria meningitidis* do grupo B foi utilizada a liberação de IL-6 e TNF- α do sangue total humano e de PBMCs durante todo o processo, demonstrando que o MAT foi altamente sensível na detecção de pirogênicos (STODDART, et al, 2010). Outro estudo

realizado por Perdomo-Morales e cols. (2011) concluiu que seus resultados associados a estudos anteriores suportam a substituição do RPT pelo MAT para Albumina Sérica Humana e para outros hemoderivados que contenham proteínas de uso terapêutico. Além disso, os autores alertaram que, apesar do LAL ser o preconizado, este apresentou problemas no percentual de recuperação da endotoxina nas condições experimentais avaliadas.

Desde 2013 alguns estudos têm sugerido a utilização de sangue bovino no lugar de sangue total humano (WUNDERLICH; SCHUMACHER; KIETZMANN, 2014). Segundo estes estudos a utilização do sangue a partir de uma raça bovina poderia suprir limitações do sangue humano em relação à quantidade e ao risco de contaminação do sangue, já que os animais poderiam ser alojados sob condições isentas de patógenos específicos. Segundo os autores, o fato do TLR de leucócitos bovinos ser comparável ao de humanos favorece a adequação do uso deste sangue para a detecção de lipopolissacárideos. Entretanto, os resultados demonstraram um desempenho inferior do sangue bovino principalmente para pirogênios não endotoxinas, indicando uma desvantagem em relação ao uso do sangue humano.

Recentemente, Koryakine e cols. (2014) desenvolveram um método de criopreservação de PBMC originados de filtros leucocitários utilizados na separação do sangue em centros de doação de sangue. No estudo foram avaliados os efeitos da criopreservação nas células leucocitárias, a viabilidade e as propriedades funcionais. Estas propriedades foram testadas pela resposta da endotoxina padrão de referência em relação ao sangue fresco, pela via de ativação do fator nuclear kappa B (NFkB) e pela estimulação do TLR por ligantes específicos (KORYAKINA; BRUEGGER, 2014).

No Brasil, a substituição dos métodos *in vivo* por métodos alternativos, foi inserida na legislação pela primeira vez com a Lei de Crimes Ambientais (Lei nº 9.605/98), a qual no artigo 32 incrimina “quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos, com penalidades de três meses a um ano de detenção, além de multa (BRASIL, 1998). Somente 10 anos depois, o Brasil passou a ter uma legislação mais específica com a aprovação da Lei 11.794/2008 que regulamentou a utilização de animais na experimentação e ensino no Brasil, além da criação do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal, o CONCEA (BRASIL, 1998). Este marco facilitou a estruturação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama) e a formação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) pela Fundação Oswaldo Cruz em parceria com a Anvisa. Na Europa a Diretiva 2010/63/EU relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos foi adotada em 22 de Setembro de 2010. A diretiva está

firmemente baseada no princípio dos 3Rs, para substituir, reduzir e aperfeiçoar a utilização dos animais para fins científicos, e entre os seus principais itens está o desenvolvimento, validação e aplicação de métodos alternativos (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2010, HARTUNG, 2010).

1.8 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS APLICADO AO CONTROLE DA QUALIDADE DO AR DE INTERIORES (QAI)

O MAT também tem sido utilizado em novos campos, como na avaliação do potencial inflamatório de bioaerossóis no ar ambiente. Essas partículas são numerosas e diversificadas, compreendendo vírus, bactérias, esporos fúngicos, poeiras orgânicas, componentes da parede celular das bactérias Gram-negativas (endotoxinas) e Gram-positivas (LTA), pelos de animais, pólen e poeira doméstica contendo ácaros (PANTOJA; COUTO; PAIXÃO, 2007). Como consequência da presença dessas substâncias nas vias aéreas e circulação sanguínea, macrófagos e monócitos podem ser ativados iniciando uma cascata de transdução de sinal com liberação de IL-1 β , TNF- α e IL-6 (BERNASCONI, et al, 2010, BONETTA, et al, 2010). A QAI é frequentemente voltada para substâncias químicas, existindo um número limitado de estudos que enfoquem a presença de uma grande quantidade de material biológico em ambientes fechados, assim como os efeitos causados à saúde pela inalação de partículas biológicas (PANTOJA; COUTO; PAIXÃO, 2007, QUADROS, et al, 2009, BONETTA et al, 2010).

Quando a exposição a esses agentes ocorre em áreas hospitalares, principalmente áreas críticas onde os pacientes possam estar imunossuprimidos, as consequências podem ser mais complexas levando ao agravamento da doença e em alguns casos ao óbito (NUNES, et al, 2005; PEREIRA, et al, 2005, ORTIZ, et al, 2009, QUADROS, et al, 2009). Da mesma forma, áreas laboratoriais que necessitem de ambientes estéreis devem ter um controle adequado para evitar a contaminação do ambiente e garantir a qualidade das análises (PASQUARELLA, PITZURRA; SAVINO, 2000).

Ao contrário dos riscos químicos ou físicos, a avaliação da exposição aos riscos biológicos não possui metodologias e padrões referenciais adequados (NUNES, et al, 2005, BERNASCONI, et al, 2010). O procedimento de amostragem é realizado por coleta de ar e poeira de forma ativa, e muitos métodos diferentes podem ser usados na quantificação e na

identificação desses microrganismos (PASQUARELLA, PITZURRA; SAVINO, 2000). Essas diferenças contribuem para a dificuldade na comparação dos resultados e, conseqüentemente, para a padronização de Valores Máximos Recomendáveis (VMR), limites que separam as condições de ausência e presença do risco de agressão à saúde humana (NUNES, et al, 2005).

A concentração de microrganismos viáveis e cultiváveis, principalmente fungos totais e bactérias, é utilizada como padrão referencial microbiológico para avaliação da QAI. Esse padrão é um parâmetro utilizado como sentinela para determinar a necessidade da busca das fontes poluentes ou das intervenções ambientais (WHO, 2010). Um grande problema na determinação dos critérios de avaliação desses microrganismos, de forma universalmente válida, é a dificuldade de medição de uma resposta proporcional do corpo humano à contaminação externa. A concentração de microrganismos vivos e cultiváveis pode não representar o risco biológico potencial do ambiente devido à presença de outros contaminantes não mensuráveis pelos métodos disponíveis (SCHINDLER, et al, 2009). No Brasil, a Anvisa regulamentou, por meio da Resolução RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003, as orientações técnicas para os “Padrões Referenciais da Qualidade do Ar de Interiores em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo”. Nessa Resolução foi definido em termos de contaminação biológica apenas o VMR para fungos totais de 750 UFCm^{-3} e a relação I/E a qual deve ser menor ou igual a 1,5, sendo I a quantidade de fungos no ambiente interior e, E a quantidade de fungos no ambiente exterior. Também são determinados nesta resolução valores de umidade relativa do ar, temperatura e contaminação química. (Anvisa, 2003; QUADROS, et al, 2009). Devido à falta de legislação adequada, alguns valores estabelecidos por órgãos internacionais, servem para fins comparativos como o da Organização Mundial de Saúde (OMS) que estabelece 500 UFCm^{-3} para populações urbanas. Este mesmo valor foi definido pela Comissão da Comunidade Europeia (CEC) para exposições não industriais moderadas. Esta classificação foi realizada em cinco níveis: i. 0-25 0 UFC m^{-3} , muito baixa; ii. 25 a 100 UFC m^{-3} , baixa; iii. 100 a 500 UFC m^{-3} , moderada; iv. 500 a 2000 UFC m^{-3} alta; e v. mais que 2000 UFC m^{-3} , muito elevada (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1993, DUTDIEWICZ, 1997; PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000, BOUILLARD, et al, 2005). Recentemente, novos estudos comprovaram a importância do uso de métodos toxicológicos *in vitro* que avaliem a atividade biológica e tornem possível a quantificação de todos os contaminantes biológicos presentes no ar ambiente (LIEBERS, et al, 2009, SCHINDLER, et al, 2009, BERNASCONI, et al, 2010) e sua relação com doenças respiratórias (CASTRO, et al, 2005). Dentro desse contexto, no qual a amostragem e a análise da qualidade

do ar são os primeiros passos para determinar se o ambiente apresenta uma ameaça potencial para as pessoas expostas, os modelos *in vitro* contribuem como uma importante ferramenta nas amostragens de medição (KINDINGER, et al, 2005, BLAAUBOER; 2008, BERNASCONI, et al, 2010).

A metodologia do MAT utilizada para produtos injetáveis de uso humano foi adaptada por Kindinger e cols. (2005) para avaliação de pirogênios no ar ambiente (BERNASCONI, et al, 2010). A vantagem do uso do MAT em relação ao uso da contagem de fungos reside no fato de refletir a carga biológica presente no ambiente independentemente da sua origem, incluindo microrganismos viáveis cultiváveis e não cultiváveis e substâncias potencialmente alergênicas (DANESHIAN; von AULOCK; HARTUNG, et al, 2009, KINDINGER, et al, 2009; SCHINDLER, et al, 2009; LIEBERS, et al, 2009; BERNASCONI, et al, 2010).

A amostragem do ar é realizada por coleta ativa com o uso de bombas individuais com fluxo definido e sistemas coletores formados por cassetes e filtros específicos (DANESHIAN; von AULOCK; HARTUNG, 2009). Os resultados são expressos em unidades equivalentes de Endotoxina por metro cúbico de ar (UEEm⁻³) sempre comparado a um padrão rastreável ao da OMS (RIECHELMANN, et al, 2007, BERNASCONI, et al, 2010). O limite utilizado é o mesmo para injetáveis, ou seja, o limite que causa febre em humanos 0,5 UEml⁻¹. Segundo Kindinger e cols. (2005) este limite pode ser aplicado já que a membrana mucosa do pulmão tem 100 m² e que sua alta capacidade de absorção das substâncias inaladas faz com que os efeitos causados pela administração intravenosa destas mesmas substâncias sejam equivalentes, entretanto ressalva que o grande problema é a falta de valores limites e métodos que reflitam melhor a exposição. Entretanto, para áreas laboratoriais e unidades de saúde não há dados para serem comparados, uma vez que o MAT só foi utilizado em áreas altamente contaminadas como fazendas (7,5 x 10³ a 3,8 x 10⁵ UEE m⁻³) e estábulos (0,1 a 16 x 10⁶ UEE m⁻³) e áreas como escritórios comerciais (KINDINGER, et al. 2005, ZUCKER; SCHARF; KERSTEN, 2006, BERNASCONI, et al, 2010). No caso de escritórios segundo Bernasconi e cols. (2005) 95% dos pontos amostrados não excederam 150 UEE m⁻³ o que significou 102–104 vezes menos atividade pirogênica do que os ambientes contaminados citados anteriormente (BERNASCONI, et al, 2005).

1.9 JUSTIFICATIVA

A contaminação de produtos injetáveis é considerada um grave problema de saúde pública e, portanto, o RPT é preconizado internacionalmente como etapa imprescindível para a avaliação do controle da qualidade de produtos injetáveis, sendo essa uma importante ação da Vigilância Sanitária. O INCQS atua como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária, atendendo ao SNVS e interagindo com organizações internacionais, vinculadas à qualidade de produtos ofertados à população. Portanto, a substituição do RPT por modelos *in vitro* deve ser implementada o mais rápido possível seguindo a tendência mundial dos 3Rs. Este modelo de substituição não só se baseia na ética, como também na Lei 9.605/98 (BRASIL, 1998), já que o uso indiscriminado de animais é caracterizado como crime, quando houver métodos alternativos.

Apesar do MAT estar presente na Farmacopeia Europeia, ele foi publicado apenas como mais um teste por falta de consistência nos dados e por não abranger todas as possibilidades de doses, pirogênios, produtos etc. Este fato ocorreu porque o ICCVAM considerou insuficiente três aspectos do estudo de validação internacional: **i)** os dados não incluíram produtos biológicos ou dispositivos médicos, além de terem sido avaliados apenas para um número restrito de produtos farmacêuticos, **ii)** os dados *in vivo* não foram gerados com as mesmas amostras utilizadas no teste *in vitro*, já que foram coletados de banco de dados anteriores ao estudo, **iii)** a necessidade de novos estudos comparando os dados *in vivo* com o *in vitro* de forma que comparações possam ser realizadas para endotoxinas e outros pirogênios, assim como deve ser ampliado o número de produtos avaliados. Dentro deste contexto, surge a necessidade de estudos que visem não só aprofundar a relação *in vivo* e *in vitro*, mas também que possam avaliar o potencial de detecção de pirogênios não endotoxinas. Devido às recomendações e limitações do teste em coelhos e do LAL, o MAT é um potencial substituto ao RPT, já que combina a sensibilidade do LAL com o grande espectro de substâncias detectáveis pelo teste em coelhos. Além disso, por utilizar células de origem humana, reflete melhor a resposta fisiológica possibilitando uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos responsáveis pela reação de febre em humanos.

Este estudo comparativo é importante no que diz respeito à aplicabilidade do MAT para produtos biológicos de interesse nacional, como soros hiperimunes, não contemplados nos

estudos internacionais. Este é o primeiro estudo de comparação *in vivo/in vitro* para soros hiperimunes.

Além disso, o estudo comparativo *in vivo/in vitro* é importante no estudo da aplicabilidade do MAT para outros pirogênios não endotoxinas como o Zymosan. Desta forma, os dados gerados por este estudo serão imprescindíveis para ações do BraCVAM em relação a futuros estudos colaborativos com Instituições similares nacionais e internacionais para que assim o MAT possa substituir completamente o uso de coelhos nos testes para detecção de pirogênios. Além disso, os resultados obtidos neste estudo já podem indicar a inclusão do MAT na Farmacopeia Brasileira como monografia para avaliação de pirogênios em soros hiperimunes.

Novas aplicações do MAT também são importantes no contexto epidemiológico sanitário e devem ser estudadas e implementadas visando contribuir também para o entendimento e a identificação dos principais problemas associados à exposição de bioaerossóis com possíveis riscos à saúde. A contaminação do ar, por causar patologias respiratórias importantes deve ser objeto relevante para o INCQS. Desta forma, o MAT pode ser importante para o entendimento da relação entre a concentração de bioaerossóis no ambiente e seus efeitos a saúde. A utilização do MAT como uma nova abordagem para avaliação da QAI é uma proposta importante do ponto de vista da Saúde Pública e da Vigilância Sanitária por ser o único método de medição relevante do total da carga inflamatória com indicação da atividade biológica. O uso do sangue humano total sugere que este sistema pode servir de modelo para a reação imune no pulmão, pelo fato dos monócitos sanguíneos serem precursores dos macrófagos teciduais tanto quanto dos alveolares.

2 OBJETIVOS GERAL

Avaliar a aplicabilidade do MAT para soros hiperimunes e na resposta ao Zymosan comparando em paralelo com o modelo *in vivo*, assim como verificar a possibilidade de aplicação do MAT na avaliação da qualidade do ar ambiental.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar nas monografias das farmacopeias os produtos injetáveis que requerem Testes de Pirogênio e de LAL e assim propor os produtos que têm por base somente o teste *in vivo*, como um ponto de partida para os estudos que serão conduzidos nessa tese, visando a avaliação e a aplicabilidade do MAT;
- avaliar o perfil hematológico e a resposta ao padrão de endotoxina do sangue criopreservado em relação ao sangue fresco utilizado no MAT durante o período de armazenamento a -80 °C;
- avaliar a aplicabilidade do MAT para soros hiperimunes através de parâmetros como teste de interferentes, limite de detecção (LD), Máxima diluição Válida (MVD), sensibilidade, especificidade e exatidão do MAT em relação ao RPT;
- comparar os resultados dos soros hiperimunes avaliados na rotina do INCQS pelo RPT e MAT (IL-1 β), comparando possíveis diferenças de resposta no MAT entre o Método A e B em amostras contaminadas artificialmente;
- avaliar a aplicabilidade do MAT na detecção de pirogênios não endotoxinas através da comparação da curva dose-resposta do Zymosan *in vivo* com o MAT (IL-1 β e IL-6)

- avaliar a aplicabilidade do MAT para detectar pirogênios em amostras de ar de laboratórios e escritórios do INCQS comparando com a análise microbiológica dos mesmos ambientes.

3 MATERIAIS, ANIMAIS E MÉTODOS

3.1 ESTÍMULOS PIROGÊNICOS

Foi utilizado LPS de *E. coli* O55:B5 como controle positivo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), Cloreto de Sódio 0,9% (Halex Istar, Goiânia, Brasil) como controle negativo e diluente das amostras e padrões e Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, Deisenhofe, Germany). O controle negativo foi testado em animais, como rotina do laboratório, e pelo método de LALc End-point, para garantia da apirogenicidade. A potência do LPS usado como controle positivo também foi testada pelo LALc End-point.

3.2 AMOSTRAS

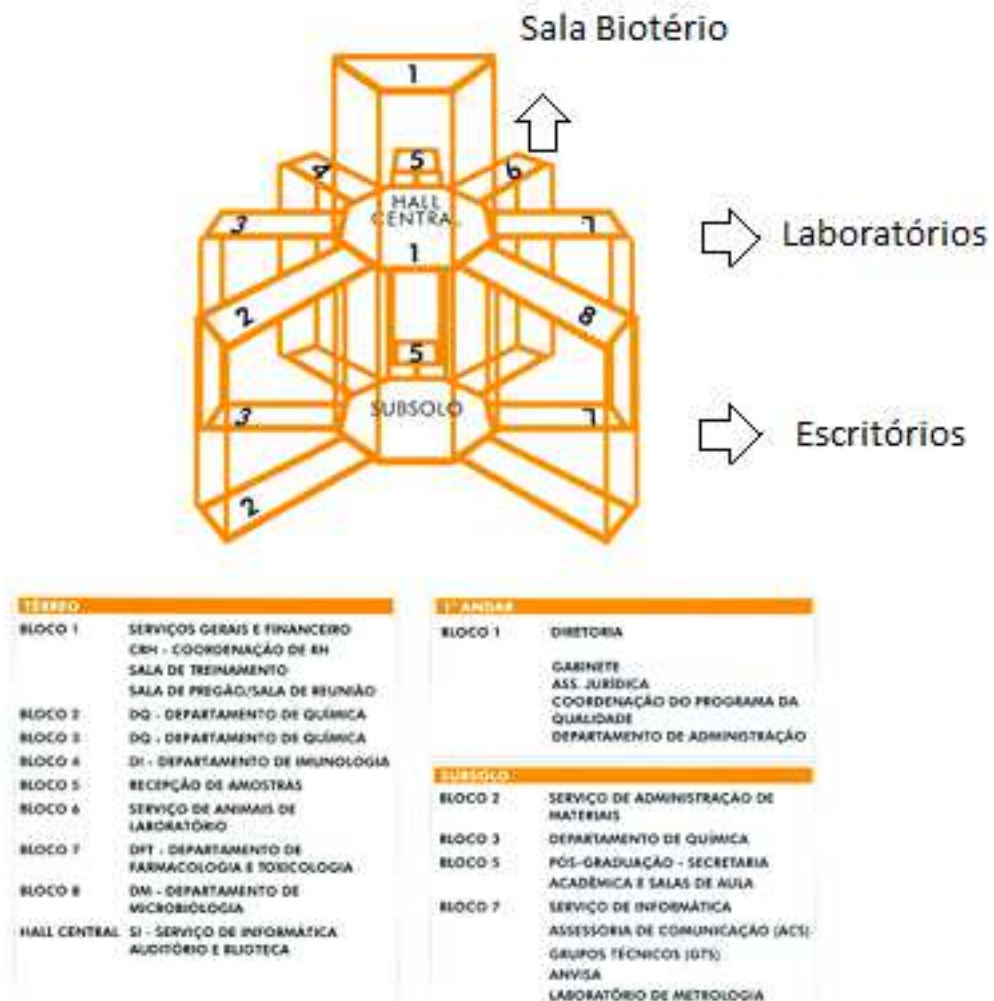
3.2.1 Soros hiperimunes

Os 43 lotes de soros hiperimunes avaliados nesse estudo, foram recebidos para análise de rotina no Setor de Pirogênio, sendo testados no RPT e posteriormente no MAT. Foram utilizados todos os resultados das amostras que foram repetidas após primeiro ensaio com resultados finais satisfatórios ou insatisfatórios no período entre 2012 e 2013. Devido ao grande número de amostras, aprovadas no primeiro ensaio neste período, estas foram sorteadas aleatoriamente para serem utilizadas no estudo. Os soros hiperimunes analisados foram provenientes de dois fabricantes (codificados como A e B) e incluíram: soro antitetrápico (SAB); antitetrápico laquéico (SABL); anticrotálico (SAC); antitetânico (SAT) e antirrábico (SAR).

3.2.2 Amostras ambientais

A avaliação do ambiente foi realizada entre dezembro 2013 a outubro de 2014 no INCQS. A avaliação foi realizada por duas metodologias em paralelo: i. análise microbiológica através da coleta de fungos viáveis em placas com meio de cultura e ii. a atividade pirogênica em filtros de politetrafluoretileno (PTFE) ambas descritas posteriormente. As amostras foram coletadas em dezembro (verão), março (outono), agosto (inverno) e setembro (primavera) e incluíram: **i.** laboratórios (Lab A e B), **ii.** uma sala do biotério (Bt) e **iii.** dois escritórios localizados no sub-solo (Escrit A e B) conforme representado na **Figura 8**. O Lab A foi considerado com o menor potencial de contaminação do que Lab B pela natureza do trabalho. No Bt foi utilizada a sala do teste de pirogênio em dias sem teste. As medições de temperatura e umidade relativa do ar (UR) foram realizadas em cada local antes da coleta com um termohigrômetro digital (Instrutherm Co.) e a vazão da sala foi medida por um anemômetro digital (Instrutherm Co.). Foi considerado 1 ponto de coleta por sala e um ponto externo aos ambientes avaliados.

Figura 8 – Mapa da estrutura física do INCQS com os respectivos locais de coleta.



Fonte: Apresentação do INCQS, 2014. Sala do biotério localizada no bloco 6, laboratórios A e B no bloco 7 e escritórios no sub-solo do bloco 7.

3.3 ANIMAIS

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Foram utilizados coelhos albinos adultos machos ou fêmeas, da raça Nova Zelândia, sadios e de peso corpóreo mínimo de 1,5 kg, mantidos em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum*, sendo fornecido feno como enriquecimento ambiental.

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Levantamento das monografias

Foi realizado um levantamento bibliográfico nas principais farmacopeias utilizadas pelo Setor de Pirogênio do Laboratório de Toxicologia do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS. Foram pesquisadas as monografias dos produtos injetáveis da Farmacopeia Americana (FA), da Farmacopeia Europeia (FE) e da Farmacopeia Brasileira (FB) que requerem o RPTe LAL. Foi elaborada uma planilha no MS-Excel® com todos os produtos e substâncias classificados pelo tipo de teste preconizado (Teste de Pirogênio *in vivo* - RPT e/ou LAL) para cada farmacopeia.

3.4.2 Teste de pirogênio *in vivo*

O Teste de pirogênio *in vivo* foi utilizado na avaliação das amostras de soros hiperimunes (mL/kg), nas soluções teste de Zymosan (1,000, 2,500, 5,000 ng/mL/kg) e para o controle negativo. As análises seguiram o critério descrito na Farmacopeia Brasileira onde no primeiro ensaio com três animais por dose, considerou-se a amostra satisfatória quando nenhum animal apresentou Variação Individual de Temperatura (VIT) igual ou superior a 0,5°C. A amostra foi repetida quando pelo menos um dos três animais alcançou esta variação. Neste caso o ensaio foi repetido com cinco novos animais sendo a amostra considerada não pirogênica (NP) se no máximo três dos oito animais apresentaram VIT igual ou superior a 0,5°C ou se o somatório das variações individuais de temperatura dos oito animais não excedeu 3,3°C. Caso contrário, a amostra/solução foi considerada pirogênica (P).

No ambiente onde foi realizado o ensaio, a temperatura foi mantida constante a 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e livre de distúrbios que pudessem incomodar os animais. Antes do ensaio, os animais foram submetidos a um pré-teste, até 72 horas anteriores ao ensaio, nas mesmas condições, apenas sem a inoculação do produto. Os animais que apresentaram VIT igual ou menor que 0,3°C foram considerados aptos para o ensaio (CALDEIRA et al, 2012).

Durante todo o período, os animais permaneceram em gaiolas de contenção, imobilizados pela região cervical de modo que assumiram uma posição sentada e confortável.

Para a realização do ensaio foram utilizados apenas animais com temperatura igual ou inferior a 39,8°C e que não apresentaram variação superior de 1,0°C dentro do grupo

As soluções-teste/amostras foram administradas pela veia marginal da orelha na dose 1 mL por quilograma de peso. Após a administração, os animais foram mantidos por três horas, com registro contínuo da temperatura, em intervalos de 30 minutos. A medida de temperatura e o cálculo da VIT foram realizados utilizando o sistema de monitoramento de pirogênio PyroMon® da Ellab. A avaliação da VIT foi realizada automaticamente pelo equipamento a partir dos critérios da Farmacopeia Brasileira, pela subtração da temperatura controle da maior temperatura individual registrada.

Após o término do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de anestésico (Tiopental, 100 mg/kg intravenosa). O teste de pirogênio em coelhos está licenciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz (L-010/05).

3.4.3 Teste de ativação de monócitos

O método A é baseado na construção de uma curva concentração-resposta do LPS na faixa de 0,125 a 5 UE mL⁻¹ de *E. coli* (controle positivo), sendo os resultados expressos em unidades equivalentes de endotoxina (UEE), que significam a média da liberação de IL-1 β / IL-6 das células sanguíneas que produzem a mesma resposta da solução de endotoxina padrão. No método B, as respostas das amostras foram comparadas a uma solução de endotoxina padrão, considerando que a liberação de citocinas das amostras acima do valor da liberação do padrão é considerada pirogênica (P) e a liberação abaixo do valor do padrão não pirogênica (NP). Como limite de Endotoxina foi utilizada a concentração de 0,5 UEmL⁻¹ (5UE10mL⁻¹) que quando administrada por via intravenosa corresponde ao aparecimento de febre em coelhos e humano (HOCHSTEIN, 1990).

3.4.3.1 Determinação do limite de detecção

O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando a curva padrão de endotoxina (0,125 a 5 UEmL⁻¹) determinando a concentração de endotoxina correspondente ao valor de *cut-off*. Este valor foi expresso como densidade óptica (OD) e foi calculado utilizando a média das quatro replicatas da resposta do branco mais três vezes o desvio padrão (D.P.) das quatro replicatas da resposta do branco.

3.4.3.2 Determinação da máxima diluição válida

A máxima diluição válida (MDV) foi calculada para o SAB por multiplicação da concentração limite de endotoxina (CLE) do SAB pela concentração do contaminante da solução de teste (C) e dividida pelo LD. A CLE foi calculada como K/M, onde K é a dose limite pirogênica de endotoxina por quilo de massa corporal por dia (5UE/kg/24 h) e M é a dose diária máxima recomendada na bula do medicamento por kg de massa corporal, portanto a dose máxima de SAB foi de 120 ml/ 70 kg/ 24 h (1,71). A CLE para o SAB foi 2,9 UE/ml (5/1,71). A MDV máxima para o SAB foi 1/324:

$$\frac{\text{CLE} \times \text{C}}{\text{LD}} = \frac{2,92 \times 5}{0,045029582} = 324,444 \text{ (1/324)}$$

Onde:

CLE = concentração limite de endotoxina (k/m)

C = concentração do contaminante (5UE)

LD = Limite de detecção

3.4.3.3 Teste de interferentes

Foi realizado para testar possíveis interferências com o MAT presentes nos soros hiperimunes. Foram utilizados três lotes de SAB estéreis e apirogênicos (Fabricante A). O ensaio foi conduzido por incubação do sangue total diluído em proporções geométricas (1/5 até 1/320) das amostras contaminadas artificialmente com 0,5 UE ml⁻¹ do LPS de *E.coli*, que foram testadas em paralelo com a diluição correspondente às mesmas amostras não contaminadas. As amostras contaminadas foram subtraídas das não contaminadas e a diferença multiplicada por 100. As diluições com recuperação de endotoxina dentro do intervalo de 50-200% foram consideradas livres de interferências e a primeira diluição com percentual de recuperação (rec %) em torno de 100% foi definida como a diluição mínima válida (DMinV). Os dados foram expressos pela média ± DP de 4 repetições.

3.4.3.4 Sangue total

O sangue foi obtido por punção venosa de doadores saudáveis (auto-declaração), de ambos os sexos, sem fazer uso de analgésicos, anti-inflamatórios, antipiréticos e antibióticos há pelo menos 15 (quinze) dias da retirada do sangue, após aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido. O sangue utilizado foi um *pool* de 4 doadores, dos quais foram coletados o mesmo volume de sangue (10 mL). Sob condições estéreis. Uma parte do sangue foi suplementada com uma parte de uma solução contendo DMSO (Wak Chemie Medical GmbH, Steinbach, Germany) e Tampão Sörensen 20% (v/v) (Acila AG, Mörfelden Walldorf, Germany) como descrito por Schindler e cols. (2006). O sangue foi aliquoteado individualmente em criotubos (Eppendorf, Hamburg, Germany) e congelado a -80° C por um período de 4 meses. Os mesmos doadores foram utilizados para todos os lotes criopreservados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP/Fiocruz) sob o número 368/07.

3.4.3.5 Contagem das células sanguíneas e comparação entre os doadores e o pool

Antes de cada criopreservação foi realizada a contagem diferencial de células sanguíneas utilizando o contador Hemogram 60 BioClin® para excluir possíveis doadores com quadro de infecção. Também foi realizado em paralelo ao estudo, o acompanhamento da contagem de leucócitos totais, de linfócitos/monócitos totais e percentuais de granulócitos de cada doador durante o tempo de congelamento. Este procedimento foi adotado em dois processos de criopreservação, realizados com intervalo de 6 meses entre cada um, utilizando-se os mesmos doadores. Uma parte do sangue fresco de cada doador foi separada para a contagem no Hemacounter 60 BioClin e para o contato com o padrão de endotoxina. A contagem foi realizada no sangue fresco de cada doador e no *pool*, discriminada por cada tipo celular (leucócitos totais, linfócitos totais e percentuais e granulócitos). O MAT foi realizado em alíquotas, de cada doador, de sangue total fresco puro e contaminado artificialmente com 0,5 UE/mL de *E. coli* (O55:B5) para se observar a reposta do sangue ao mesmo controle positivo durante os 4 meses de armazenamento a -80°C. O restante do sangue foi aliquoteado nos criotubos após o procedimento e criopreservado para as análises posteriores. As leituras

foram realizadas no dia da coleta e após sete dias, seguindo-se períodos de 15 dias até completar os 120 dias em que o sangue ficou estocado congelado.

3.4.3.6 Preparação da amostra e incubação

As aliquotas de sangue criopreservado foram retiradas do freezer e colocadas por 15 minutos em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. O processo de incubação das amostras com o sangue fresco e criopreservado foi realizado respectivamente: **i.** amostras líquidas: 1000 µl /900 µl de Cloreto de Sódio 0,9%, 100 µl/200 µl de sangue e 100 µl da amostra ou controles (**Quadros 2 e 3**). **ii.** amostras dos filtros: 2700 µl de Cloreto de Sódio 0,9%, 600 µl de sangue e 300 µl dos controles (**Quadro 4**). No caso dos cassetes para o controle negativo e curva padrão foram utilizados filtros limpos apenas contaminados artificialmente com as soluções da curva ou com o controle negativo. Os tubos abertos ou cassetes foram colocados em estante apropriada, cobertos com papel alumínio em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 16 horas aproximadamente. Após o período de incubação, os microtubos foram fechados e misturados vigorosamente por inversão e o resultado da incubação dos cassetes também passados para microtubos. As soluções pós-incubação foram analisadas imediatamente ou congeladas até o momento da análise (**Figura 9**).

Quadro 2 – Esquema de incubação do sangue total humano fresco em microtubos para amostras líquidas

Microtubos	Controle negativo (µL)	Controle Endotoxina (µL)	Amostra (µL)	Amostra contaminada (µL)
Cloreto de Sódio 0,9%	1100	1000	1000	1000
Solução de endotoxina	-----	100	-----	-----
Amostra	-----	-----	100	100
Sangue fresco	100	100	100	100
Volume final	1200	1200	1200	1200

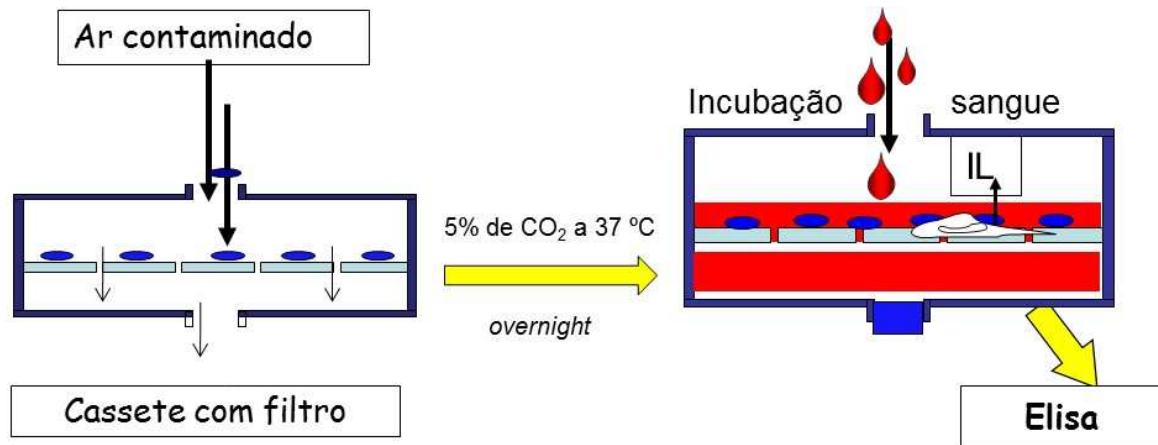
Quadro 3 – Esquema de incubação do sangue total humano criopreservado em microtubos para amostras líquidas

Microtubos	Controle negativo (µL)	Controle Endotoxina (µL)	Amostra (µL)	Amostra contaminada (µL)
Cloreto de Sódio 0,9%/RPMI	1000	900	900	900
Solução de endotoxina	-----	100	-----	-----
Amostra	-----	-----	100	100
Sangue criopreservado	200	200	200	200
Volume final	1200	1200	1200	1200

Quadro 4 – Esquema de incubação do sangue total criopreservado para filtros

Cassetes	Controle negativo (µL)	Controle Endotoxina (µL)	Amostra (µL)	Amostra contaminada (µL)
Cloreto de Sódio 0,9%	3.000	2.700	3.000	2.400
Solução de endotoxina	0	300	0	300
Amostra de ar (filtro)	0	0	0	300
Sangue criopreservado	600	600	600	600
Volume final	3.600	3.600	3.600	3.600

Figura 9 – Processo de incubação dos filtros (amostras e controles positivos e negativo) com o sangue criopreservado.



Fonte: Adaptado da apresentação do Dr. Tomas Hartung 2010 (INCQS/Fiocruz). As partículas coletadas ficam retidas nos filtros, onde posteriormente o sangue é colocado e reage com as partículas durante o processo de incubação liberando os mediadores inflamatórios que posteriormente são dosados por ELISA.

3.4.3.7 Determinação de citocinas

Para a determinação da liberação de IL-1 β e IL-6 foi utilizado o kit comercial da R&D Systems com a sensibilidade de 3,9 a 250 pg/mL para IL-1 β e 3,12 - 300 pg/mL para IL-6. Os dados foram expressos em média (\pm) D.P. de 4 replicatas. Foi utilizado o leitor VersaMax (Molecular Device, software SoftMax® Pro5).

- Curva padrão de IL-1 β :

Foram adicionados 500 μ L do diluente RD6C em seis tubos referentes às concentrações de 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8 e 3,9 pg/mL. Após a reconstituição do padrão na concentração de 250 pg/mL, 500 μ L desta solução foram transferidos para o tubo referente a 125 pg/mL e assim sucessivamente até 3,9 pg/mL.

- Curva padrão de IL-6:

Foram pipetados 667 μ L do diluente RD6F para o tubo correspondente à concentração de 125 pg/ml e 500 μ L nos demais 5 tubos referentes às concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 pg/mL. Após a reconstituição do padrão na concentração de 300 pg/mL, foram transferidos de forma seriada, 333 μ L para o tubo referente a 150 pg/mL e partir deste 500 μ L para os demais pontos da curva, sucessivamente, até 3,12 pg/mL.

Para a dosagem nas microplacas de IL-1 β e IL-6, 50 μ L do diluente RD1-83 foram distribuídos em cada poço. Depois foram adicionados 200 μ L do padrão/amostras nas placas correspondentes a IL-1 β e 100 μ L para IL-6. As placas foram cobertas com adesivo, incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Após esse período, o conteúdo foi desprezado e os poços foram aspirados e lavados por 3 vezes para IL-1 β e quatro (OBS: a regra era usar números por extenso até nove e numeral 10 e acima) vezes para IL-6 com 400 μ L do tampão de lavagem. Após a lavagem foram adicionados 200 μ L do conjugado em cada poço e as placas foram incubadas pela segunda vez à temperatura ambiente por duas horas, seguindo-se um novo procedimento de lavagem. Após a lavagem, foram adicionados 200 μ L do substrato em cada poço para IL-1 e 100 μ L para IL-6 e a placa foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. Só então foram adicionados 50 μ L da solução de parada. A placa foi suavemente agitada para homogeneizar a cor e foi realizada a leitura dentro de 30 minutos.

3.4.4 Teste de Endotoxina Bacteriana

Foi utilizado o método do LAL Cromogênico *End Point* (LONZA®), um teste quantitativo, que utiliza um substrato cromóforo para detecção colorimétrica. O LAL foi realizado para atestar a potência do LPS na concentração de 0,5 UEmL⁻¹. Todas as soluções foram preparadas conforme descrito no manual que acompanha o kit (QCL-1000, BioWhitaker).

3.4.4.1 Preparo da curva-padrão

Foi preparada uma solução de endotoxinas, contendo 1,0 UEmL⁻¹, a partir da solução estoque do padrão. Para tal, foi diluído 1/x, onde x é a potência de endotoxinas declarada pelo fabricante a partir do lote do kit. As diluições foram preparadas de acordo com o **Quadro 5**.

Quadro 5 – Preparo das concentrações de endotoxinas da curva padrão do Kit LAL Cromogênico *End Point*.

Conc. Endotoxina (UEmL ⁻¹)	Volume solução estoque de 1 UEmL ⁻¹	Volume solução padrão de 1 UEmL ⁻¹	Volume de água apirrogênica
1,0	0,1 mL	-----	x-1/10mL
0,5	-----	0,5 mL	0,5 mL
0,25	-----	0,5 mL	1,5 mL
0,1	-----	0,1 mL	0,9 mL

X= potência do lote

EU= unidade de endotoxina

3.4.4.2 Procedimento do ensaio

Após preparo dos pontos da curva padrão e das concentrações avaliadas foi seguido o procedimento do **Quadro 6** com a microplaca pré-aquecida a 37 °C, em aquecedor de blocos.

Para a realização do ensaio foram colocados 50 µL da curva padrão do kit (item 3.3.1) e 50 µL das diluições de LPS ou ALT, em duplicata, nos poços da microplaca. A água apirogênica foi utilizada como branco. No tempo 0 (t=0), 50 µL do lisado (LAL) foram adicionados e a placa foi agitada suavemente, através de leves batidas na lateral. Em seguida a placa foi incubada por 10 minutos a 37 °C. No tempo 10 min (t=10), foram adicionados 100 µL do substrato cromogênico agitando suavemente posteriormente. A placa foi incubada por mais seis minutos a 37 °C. Após esse período, foram adicionados 50 µL da solução de parada agitando suavemente. A leitura foi realizada em densidade ótica de 405-410 nm em no máximo 30 minutos utilizando leitor VersaMax (Molecular Device, software SoftMax® Pro5).

Quadro 6 –Etapas do procedimento do Teste de Endotoxina Bacteriana.

Etapas	Amostra	Branco
Diluições avaliadas ou padrão	50 µL	-----
Água apirogênica	-----	50 µL
Lisado (LAL)	50 µL	50 µL
Misturar e incubar a 37 °C	-----	10 min -----
Substrato cromogênico	100 µL	----- 100 µL
Misturar e incubar a 37 °C	-----	6 min -----
Solução de parada	50 µL	----- 50 µL

3.4.4.3 Cálculo da concentração de endotoxina

O cálculo da concentração de endotoxina foi realizado subtraindo-se a média das absorvâncias do branco, da média das absorvâncias dos padrões e das diluições avaliadas para calcular a variação da absorvância média (Δ abs média). A concentração de endotoxina foi determinada através do cálculo de regressão linear. Todos os cálculos foram realizados utilizando a programação pré-definida no equipamento de leitor de ELISA VersaMax, Molecular Devices, software SoftMax® Pro5.

3.4.5 Contagem dos fungos viáveis

A amostragem foi realizada de acordo com a Resolução nº 09/2003 da Anvisa, utilizando-se um Impactador (MAS 100 MERCK®) a uma altura de 1,50 m do chão. O aparelho foi ligado por 10 minutos em cada local de coleta, totalizando 283 litros de ar por amostragem (fluxo de 28,3 L/min), com placas de Petri com meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA–Difco). Após a coleta, as placas foram incubadas em DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 25 °C por 7 dias. No sétimo dia as colônias foram contadas e expressas em Unidades Formadoras de Colônias por metro cúbico de ar (UFCm⁻³). Com a contagem das colônias, foi calculada a relação entre interior/exterior, como preconizado pela Resolução nº 09/2003 Anvisa.

3.4.6 Análise da atividade pirogênica

O ar foi coletado por bombas com fluxo ajustado para 1L/min e cassetes de 37 mm de diâmetro contendo filtros de PTFE com poros de 5 μ m (**Figura 10**) para coleta dos contaminantes biológicos incluindo as partículas respiráveis. Os cassetes foram montados previamente à análise em cabine de segurança biológica e fechados com pino de entrada (azul) e saída de ar (vermelho). O filtro foi colocado entre as duas partes do cassete que foi conectado a bomba por meio de uma mangueira de ar. Após a coleta os cassetes foram incubados por 16 horas e analisados no MAT como descrito no item 3.4.2.6.

Figura 10 – Montagem dos cassetes com os filtros antes da coleta.



3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o Teste de Mann-Whitney ($\alpha = 5\%$) para comparar as médias de diferentes concentrações no MAT através do programa estatístico GraphPrism Pro versão 6.0. Os resultados da comparação dos soros hiperimunes *in vivo* e *in vitro* foram realizados através da classificação dos resultados em uma tabela de contingência. Os seguintes parâmetros foram calculados: a sensibilidade (a proporção de resultados concordantes positivos no *in vivo* e no *in vitro* classificados como pirogênicos); especificidade (proporção de resultados negativos concordantes no *in vivo* e *in vitro* classificados como não pirogênicos); exatidão (a proporção de predições corretas, soma dos verdadeiros positivos e negativos); falsos positivos e falsos negativos.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DAS MONOGRAFIAS QUE PRECONIZAM TESTES DE PIROGENICIDADE

Devido à necessidade de selecionar as classes de produtos a serem testadas em relação a aplicabilidade do MAT, foi realizado um levantamento bibliográfico junto as principais farmacopeias (FB, FA e FE) que possuem monografias para produtos injetáveis. O objetivo foi verificar quais destes produtos devem ser avaliados para testes de pirogenicidade *in vitro* (LAL) e/ou *in vivo* (RPT). Os resultados compilados na **Tabela 1** indicaram que somente 4 produtos presentes nas 3 farmacopeias devem ser testados no LAL e/ou RPT, sendo que a Ampicilina Sódica, além de preconizado para o LAL na FE também possui monografia para o MAT (HOFFMANN et al, 2005).

Os testes RPT e LAL são preconizados para 639 produtos na FA, 194 na FE e 69 na FB. Quando as monografias são separadas por testes pode ser observado que o LAL é mais utilizado do que o RPT, sendo preconizado em 619 monografias da FA, 157 da FE e 41 na FB (**Figura 11**). A grande diferença no quantitativo de monografias entre Estados Unidos e demais países se deve, em grande parte, aos medicamentos que, no caso do Brasil e Europa, passam unicamente por teste de esterilidade.

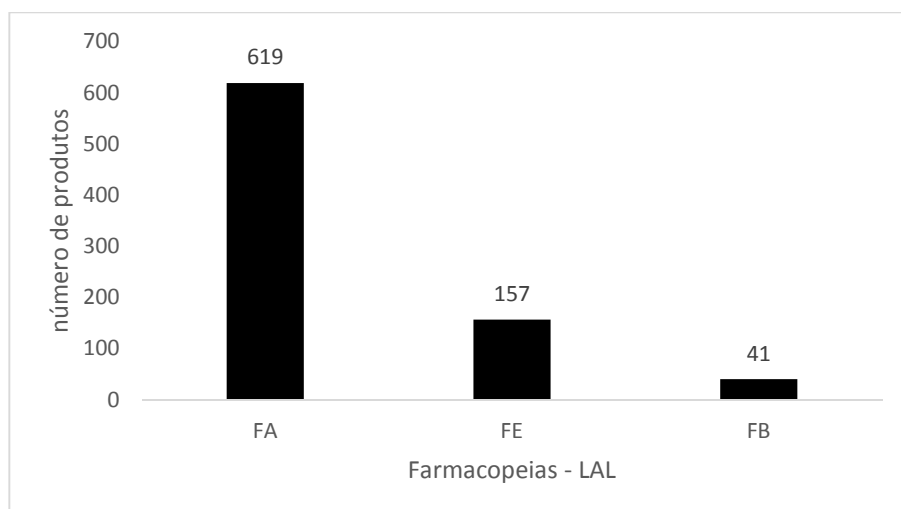
Tabela 1 – Monografias dos produtos que são avaliados por testes de pirogenicidade nas três farmacopeias.

Produto	FB		FA		FE	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Água p/ Injetáveis	-----	LAL	-----	LAL	-----	LAL
Ampicilina Sódica	RPT	LAL	-----	LAL	-----	LAL/MAT
Cefoxitina Sódica	-----	LAL	-----	LAL	-----	LAL
Heparina Sódica	-----	LAL	-----	LAL	-----	LAL

Fb= Farmacopeia Brasileira; FA = Farmacopeia Americana, FE= Farmacopeia Européia

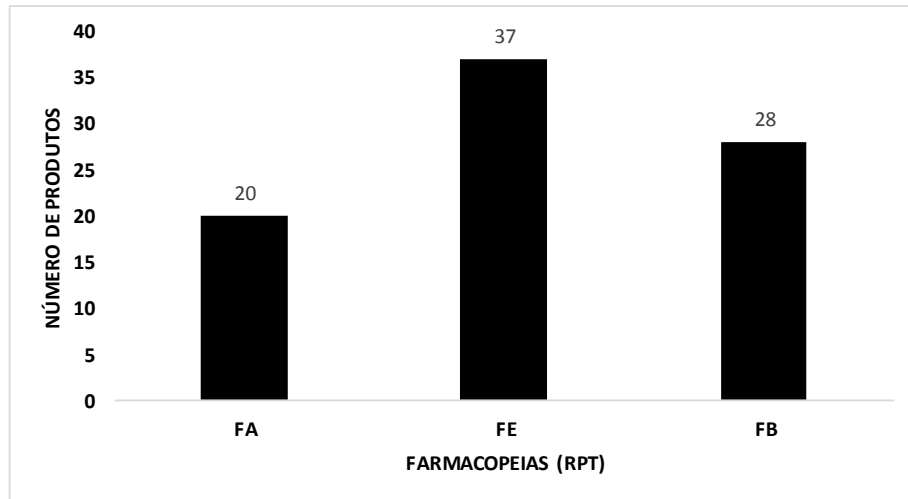
RPT = Rabbit pyrogen test; LAL = *Limulus* ameocyte lysate; MAT = Monocyte activation test

Figura 11 – Número de monografias de produtos injetáveis nas Farmacopeias dos Estados Unidos (FA), Europeia (FE.) e Brasileira (FB) que requerem o LAL.



Apesar de menos utilizado do que o LAL, o RPT é preconizado em todas as farmacopeias, sendo 20 monografias na FA, 37 na FE e 28 na FB (**Figura 12**).

Figura 12 – Número de monografias de produtos injetáveis da Farmacopeia dos Estados Unidos (FA), Europeia (FE) e Brasileira (FB) que requerem o RPT



Os resultados também foram avaliados em relação às classes de produtos preconizados nas monografias para cada teste descrito na FB. Dos 69 produtos, 41 fazem exclusivamente o LAL e 28 o RPT. No primeiro caso, dos 41 produtos injetáveis, 39 são medicamentos e apenas dois são produtos biológicos (vacinas febre amarela e anti-poliomielite 1, 2, 3 inativada). No caso das 28 monografias que preconizam o RPT, 9 são medicamentos, sendo que destes três fazem exclusivamente o RPT representando 33% destes produtos (Arteméter, Cloridrato de Metoclopramida e Flunitrazepam). Os 19 restantes são produtos biológicos (hemoderivados, vacinas e soros hiperimunes), sendo que 17 são avaliados exclusivamente pelo RPT, representando 89% destes produtos (**Tabela 2**) e, deste total, os soros hiperimunes, representam 68%.

Portanto, com base nos resultados do levantamento das monografias dos produtos que são avaliados pelo RPT e na importância do controle da qualidade destes produtos no Brasil, os produtos biológicos são os mais indicados como ponto de partida para estudos de aplicabilidade do MAT, destacando que na Farmacopeia Brasileira os soros hiperimunes representam um percentual significativo deste total. Os dados desta etapa do estudo foram submetidos a análise da Revista Visa em debate e o artigo aceito para publicação encontra-se disponível no ANEXO A.

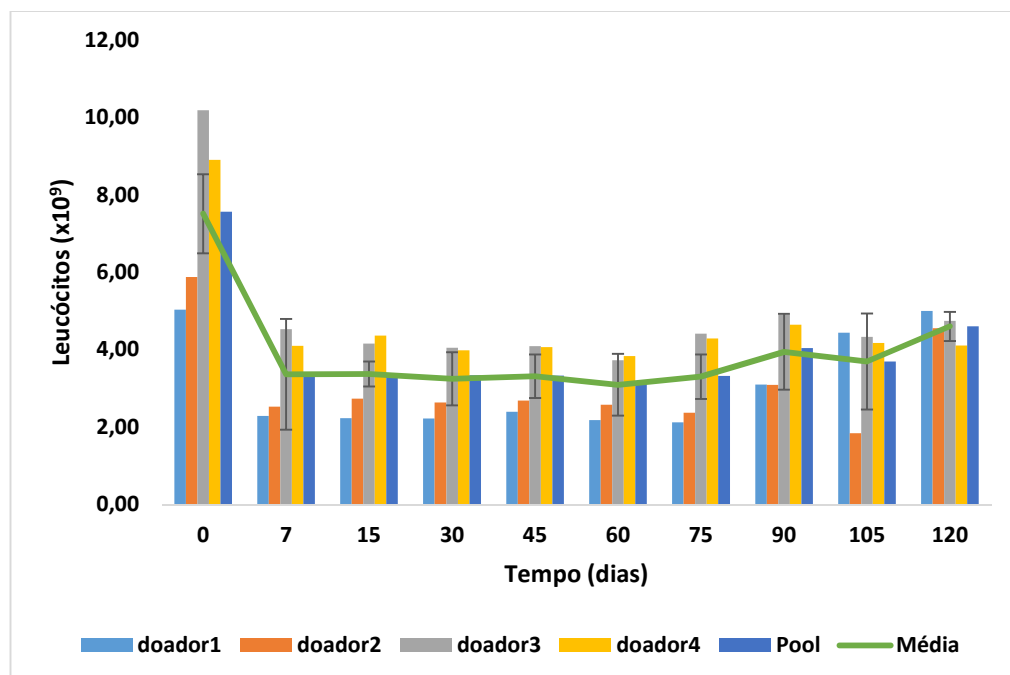
Tabela 2 – Monografias da Farmacopeia Brasileira: produtos injetáveis que requerem o RPT e LAL (*in vitro*). A área preenchida (escura) representa os testes solicitados.

Produtos	Classificação	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Ampicilina	Medicamento		
Ampicilina Sódica	Medicamento		
Ampicilina Sódica (Pó)	Medicamento		
Ampicilina Tri-Hidratada	Medicamento		
Arteméter	Medicamento		
Cloridrato de Metoclopramida	Medicamento		
Flunitrazepam	Medicamento		
Glicose	Medicamento		
Sulfato de Morfina	Medicamento		
Fator VII humano	Biológico		
Fator VIII humano	Biológico		
Fator IX humano	Biológico		
Fibrinogênio humano	Biológico		
Plasma humano	Biológico		
Soro Anti-botrópico crotálico laquétrico	Biológico		
Soro Anti-botrópico crotálico	Biológico		
Soro Anti-botrópico laquétrico	Biológico		
Soro Anti-botrópico	Biológico		
Soro Anti-botulínico	Biológico		
Soro Anti-crotálico	Biológico		
Soro Anti-difitérico	Biológico		
Soro Anti-elapidico	Biológico		
Soro Anti-escorpiônico	Biológico		
Soro Anti-Ionômico	Biológico		
Soro Anti-loxoscélico	Biológico		
Soro Anti-rábico	Biológico		
Soro Anti- tetânico	Biológico		
Vacina Anti-rábica inativada	Biológico		
Vacina Anti-poliomielite 1,2 3 inativada	Biológico		
Vacina Febre amarela	Biológico		

4.2 PERFIL HEMATOLÓGICO E A RESPOSTA AO PADRÃO DE ENDOTOXINA DO SANGUE CRIOPRESERVADO EM RELAÇÃO AO SANGUE FRESCO UTILIZADO NO MAT DURANTE O PERÍODO DE CONGELAMENTO

Neste estudo foi avaliado o número de glóbulos brancos (leucócitos) separados por tipo celular no sangue fresco (dia 0) e no sangue criopreservado entre 7 e 120 dias em análises quinzenais. Os resultados demonstram que, apesar da redução dos leucócitos totais, a partir do sétimo dia em relação ao sangue fresco, o mesmo permaneceu estável até o final do período de congelamento (**Figura 13**). Apesar da aparente diferença entre os doadores, o uso do *pool* tende a equalizar os resultados.

Figura 13 – Distribuição da contagem do número de leucócitos totais (linfócitos/monócitos e granulócitos) por tempo de congelamento.



Média dos 4 doadores (\pm D.P).

Quando os resultados são separados por tipo celular, pode ser observado que os granulócitos (%), neutrófilos, basófilos e eosinófilos, apresentaram uma redução mais acentuada do que os agranulócitos constituídos pelos linfócitos e monócitos (**Figuras 14 e 15**). Portanto, o processo de criopreservação foi eficiente para preservar as principais células produtoras de IL-1 β (linfócitos e monócitos) durante o armazenamento.

O sangue fresco também foi comparado ao sangue criopreservado, durante o período de congelamento, em relação à resposta de IL-1 β no segundo lote de sangue criopreservado. O sangue de cada doador e o *pool* foi avaliado puro e contaminado artificialmente com LPS (5 UEmL⁻¹). Na **Figura 16** pode ser observado que o sangue contaminado respondeu de forma significativa em relação ao sangue não contaminado de cada doador e do *pool* ($p \leq 0,05$, Teste de Mann-Whitney). Em contrapartida, não houve diferença significativa na liberação de IL-1 β entre o sangue fresco e os demais dias de criopreservação dos doadores individualmente e no *pool* ($p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney). Portanto, este ensaio ratifica o anterior onde linfócitos/monócitos estão preservados e funcionalmente ativos durante todo o tempo de armazenamento.

Figura 14 – Distribuição da contagem de agranulócitos (Linfócitos/monócitos) por tempo de congelamento: (a) número de linfócitos/monócitos totais (b) percentual de linfócitos/monócitos. Média dos 4 doadores (\pm D.P).

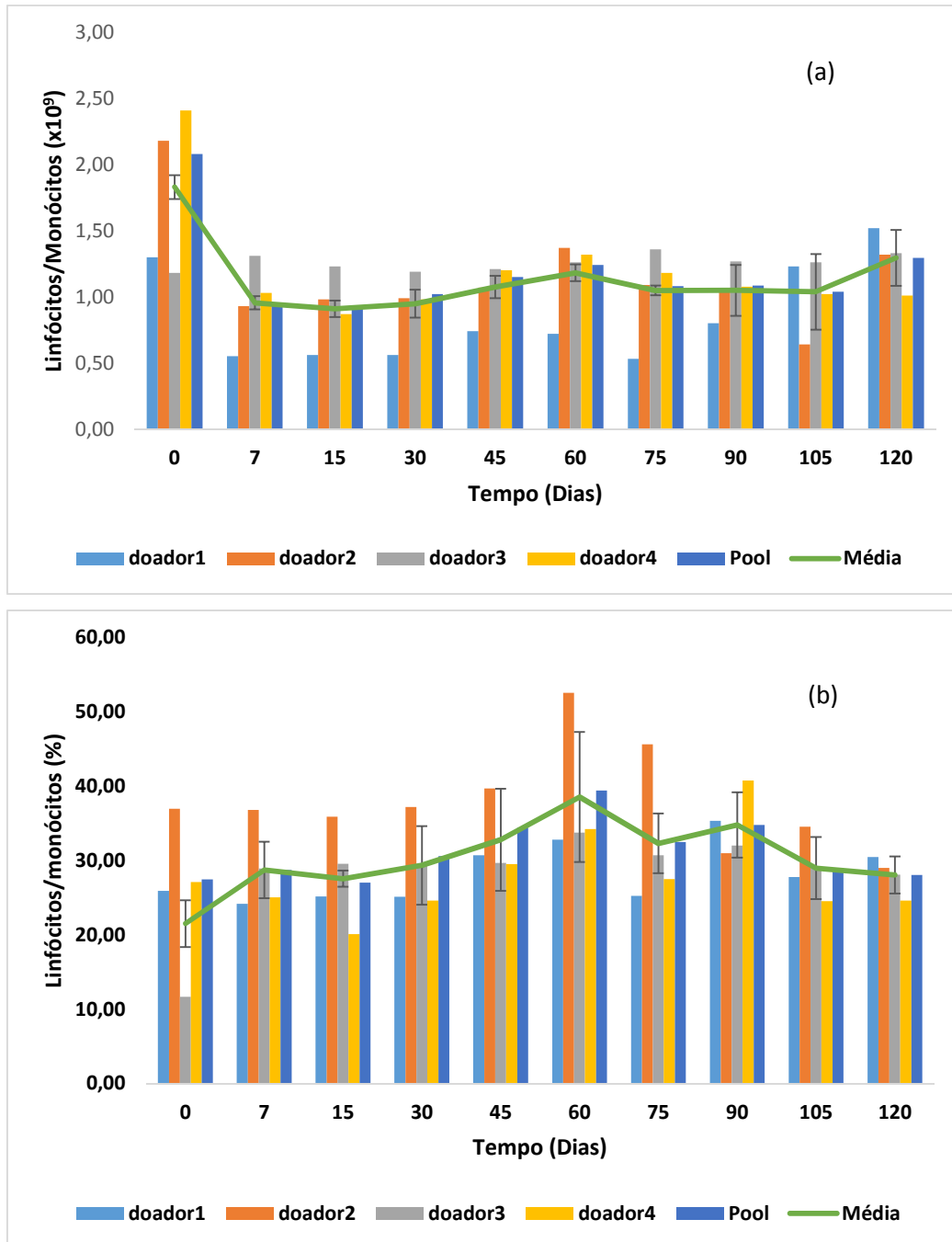


Figura 15 – Distribuição da contagem de granulócitos por tempo de congelamento: (a) número de granulócitos (b) percentual de granulócitos. Média dos 4 doadores (\pm D.P).

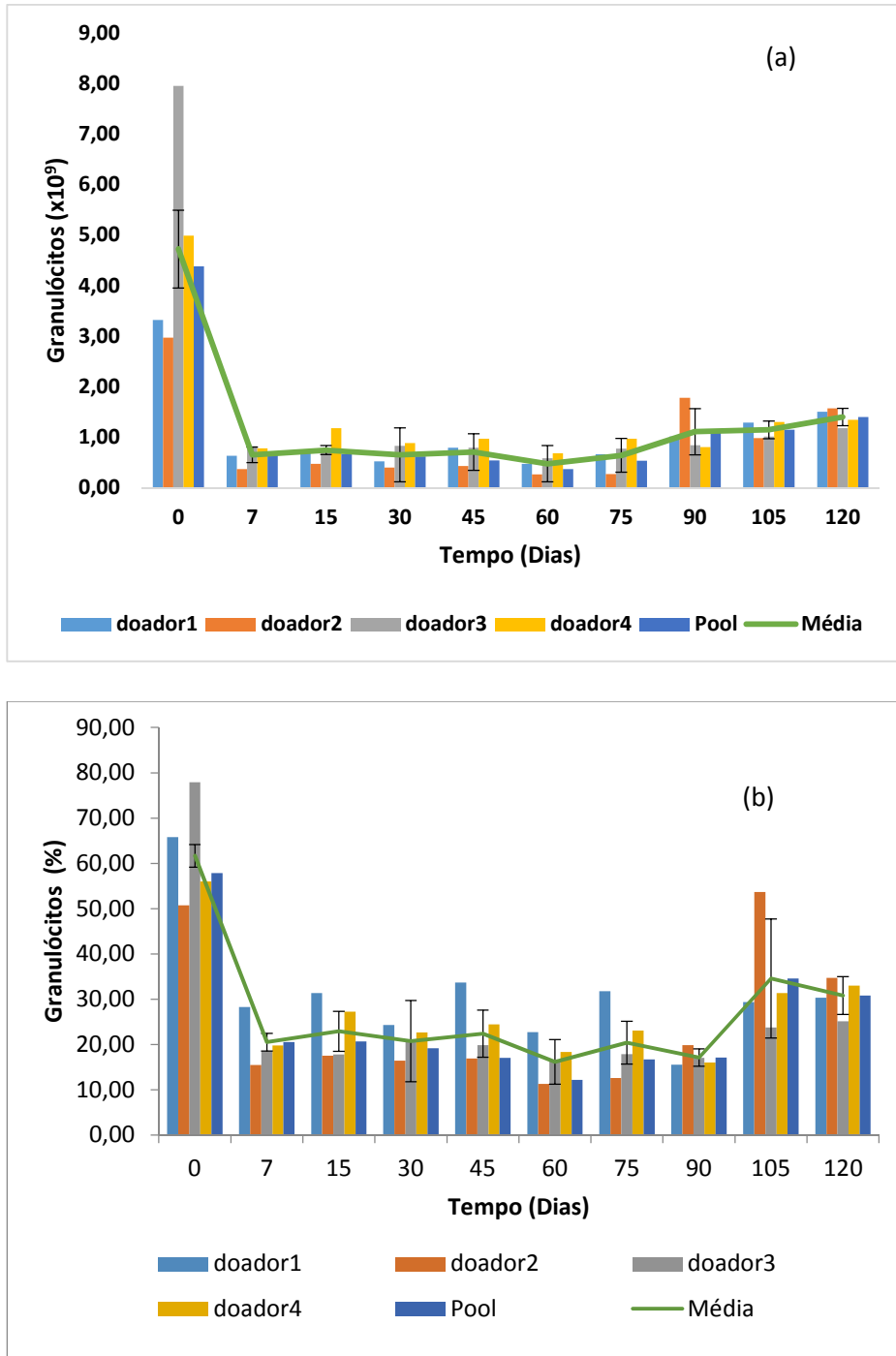
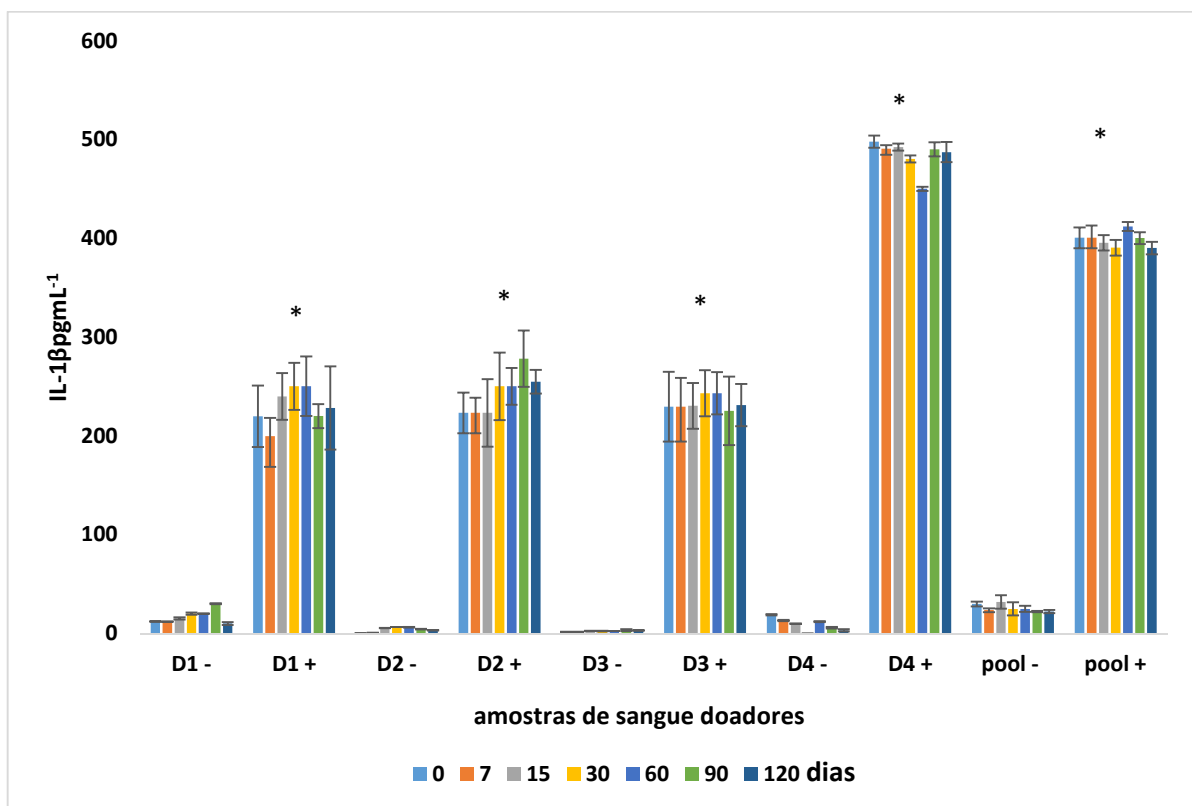


Figura 16 – Comparação da resposta do sangue fresco (dia 0) e criopreservado (7-120 dias) durante o tempo de congelamento considerando o sangue individualmente e do *pool*. D=doador. D(-): sangue não contaminado artificialmente. D(+): sangue contaminado com LPS (0,5 UEmL⁻¹). Resultados de IL-1 β (pg/mL) foram médias de 4 replicatas de 1 experimento (\pm D.P.). * $p \leq 0,05$ diferença estatisticamente significativa entre D (-) e D (+); *pool* (-) e *pool* (+). Não houve diferença significativa dentro do mesmo grupo, ou seja, mesmo doador ente os dias.



4.3 APLICABILIDADE DO MAT PARA SOROS HIPERIMUNES

O primeiro passo para testar a aplicabilidade do MAT na detecção de contaminantes pirogênicos em soros hiperimunes, foi a avaliação de determinados parâmetros como o LD, MVD e TI. O LD foi calculado a partir de quatro replicatas do branco mais três vezes o D.P., respectivamente 0,045 e 0,042 para IL-1 β e IL-6. A partir do LD pode ser calculada a MDV do SAB, cujo valor foi 1/324. Cabe ressaltar que foi utilizado o mesmo lote de sangue criopreservado para todas as análises de soros hiperimunes. O TI foi realizado utilizando-se quatro lotes de SAB (Fabricante A), estéreis e apirogênicos. Esse soro foi selecionado por ser numericamente o mais utilizado pelo PNI e o mais analisado pelo INCQS. Os três lotes foram avaliados anteriormente pelo RPT e aprovados nos critérios do teste no primeiro ensaio. Como o intervalo de quantificação de endotoxina no MAT foi entre 0,125 e 5 UE mL⁻¹, as amostras foram contaminadas artificialmente com 0,5 UE mL⁻¹ (um dos pontos intermediários da curva) do LPS de *E. coli*. O TI foi realizado a partir do SAB puro e das diluições em progressão geométrica e abaixo da MDV. Pode ser observado na **Tabela 3** que foi possível quantificar a resposta de IL-1 β e IL-6 ao LPS entre 50-200% em quase todas as diluições com exceção do lote A na diluição 1/5. Portanto, com base nos resultados foi estabelecida a diluição de 1/10 como a DMinV por representar a diluição a partir da qual o LPS foi recuperado acima de 100% para todos os lotes e leituras.

Tabela 3 – Recuperação de endotoxina (%) obtida no Teste de Interferente para SAB no MAT utilizando sangue criopreservado com detecção de IL-1 β e IL-6 como parâmetros de leitura. A recuperação (Rec) foi calculada a partir da média da leitura de quatro replicatas de SAB contaminadas artificialmente com 0,5 UEmL⁻¹ (SAB₍₊₎) e a mesma amostra não contaminada (SAB₍₋₎) aplicando a seguinte fórmula: % de rec = (SAB₍₊₎ – SAB₍₋₎ / 0,5) X 100.

Parâmetro de leitura	Lotes	Diluições							
		0	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
IL-1 β	A	≤50	≤50	199	132	112	105	111	74
	B	≤50	56	103	149	100	152	161	147
	C	≤50	115	119	115	134	105	110	146
	D	≤50	51	181	110	129	176	111	113
IL-6	A	≤50	60	100	170	137	110	149	178
	B	≤50	78	167	≥200	130	190	159	184
	C	≤50	65	105	≥200	≥200	169	134	176
	D	≤50	59	132	≥200	130	179	149	178

A **Tabela 4** apresenta a comparação entre os resultados das amostras analisadas no RPT e no MAT nos mesmos lotes, tendo IL-1 β como parâmetro de leitura. Os lotes 1 a 25 foram analisados no RPT, os lotes 26-40 foram analisados no RPT após a repetição e os lotes 41, 42 e 43 foram reprovados no RPT.

O MAT foi realizado pelo método A, onde os resultados são quantificados em UEmL⁻¹ e classificados como NP ou P, e pelo método B qualitativo, onde os lotes foram classificados como NP e P. O controle positivo foi de 5 UEmL⁻¹ que é o limite de febre em coelhos e no homem (HOCHSTEIN, 1990). Pode ser observado no MAT, que os lotes 1 ao 33 passaram no método A e B entretanto, os lotes 34 e 35 tiveram resultados discordantes entre si, onde o método B reprovou as amostras e o Método A aprovou. Quando os resultados entre o RPT e MAT são comparados pelo método A, os lotes 1 a 35 são aprovados e em relação ao Método B, somente os lotes 1 a 33 foram aprovados. Entre os lotes 36 e 40 o MAT reprovou as amostras pelos dois métodos, enquanto o RPT, após a repetição, aprovou os mesmos lotes. Todas as amostras reprovadas no RPT foram reprovadas no MAT pelos dois métodos.

Tabela 4 – Comparação dos resultados entre o RPT e o MAT (A e B) em relação a avaliação da contaminação pirogênica nos lotes de Soros Hiperimunes de diferentes fabricantes.

Produtor	Lotes	Amostras	Variação individual de temperatura	Animais* $\geq 0.5^{\circ}\text{C}$	RPT ($\Sigma \Delta T$)** ($^{\circ}\text{C}$)	MAT (UEE/ml) ^a	MAT ^b
A	1	SAT	0,20; 0,20; 0,00	0	0,4 ^{NP}	0,31 \pm 0,15 ^{NP}	NP
A	2	SAB	0,30; 0,00; 0,00	0	0,3 ^{NP}	0,16 \pm 0,03 ^{NP}	NP
A	3	SAB	0,00; 0,20; 0,20	0	0,4 ^{NP}	0,16 \pm 0,12 ^{NP}	NP
A	4	SAB	0,00; 0,10; 0,00	0	0,1 ^{NP}	0,18 \pm 0,04 ^{NP}	NP
A	5	SAB	0,30; 0,20; 0,20	0	0,7 ^{NP}	0,43 \pm 0,2 ^{NP}	NP
A	6	SAB	0,00; 0,20; 0,20	0	0,4 ^{NP}	0,82 \pm 0,01 ^{NP}	NP
B	7	SAR	0,00; 0,10; 0,20	0	0,3 ^{NP}	2,85 \pm 0,10 ^{NP}	NP
B	8	SAB	0,10; 0,00; 0,00	0	0,1 ^{NP}	0,16 \pm 0,80 ^{NP}	NP
B	9	SAB	0,20; 0,20; 0,00	0	0,4 ^{NP}	0,31 \pm 0,05 ^{NP}	NP
B	10	SAB	0,10; 0,10; 0,20	0	0,4 ^{NP}	0,18 \pm 0,02 ^{NP}	NP
B	11	SAB	0,00; 0,00; 0,00	0	0 ^{NP}	0,82 \pm 0,01 ^{NP}	NP
A	12	SAB	0,40; 0,20; 0,20	0	0,3 ^{NP}	0,25 \pm 0,01 ^{NP}	NP
B	13	SAB	0,10; 0,10; 0,20	0	0,4 ^{NP}	0,02 \pm 0,08 ^{NP}	NP
A	14	SAB	0,00; 0,00; 0,00	0	0 ^{NP}	0,82 \pm 0,01 ^{NP}	NP
B	15	SAB	0,00; 0,00; 0,10	0	0,1 ^{NP}	0,8 \pm 0,01 ^{NP}	NP
B	16	SAB	0,00; 0,00; 0,00	0	0 ^{NP}	0,05 \pm 0,02 ^{NP}	NP
A	17	SAB	0,00; 0,00; 0,20	0	0,2 ^{NP}	0,85 \pm 0,012 ^{NP}	NP
B	18	SAB	0,00; 0,40; 0,00	0	0,4 ^{NP}	0,15 \pm 0,03 ^{NP}	NP
B	19	SAR	0,20; 0,00; 0,00	0	0,2 ^{NP}	0,55 \pm 0,04 ^{NP}	NP
B	20	SAB	0,00; 0,10; 0,00	0	0,1 ^{NP}	0,49 \pm 0,01 ^{NP}	NP
B	21	SAC	0,00; 0,10; 0,10	0	0,2 ^{NP}	0,05 \pm 0,02 ^{NP}	NP
B	22	SABL	0,00; 0,30; 0,10	0	0,4 ^{NP}	0,64 \pm 0,01 ^{NP}	NP
B	23	SAB	0,00; 0,20; 0,20	0	0,4 ^{NP}	0,12 \pm 0,02 ^{NP}	NP
B	24	SAR	0,00; 0,00; 0,00	0	0,1 ^{NP}	0,15 \pm 0,02 ^{NP}	NP
B	25	SAR	0,10; 0,00; 0,00	0	1 ^{NP}	0,55 \pm 0,43 ^{NP}	NP
B	26	SAC	0,50; 0,10; 0,00; 0,20; 0,00; 0,20; 0,00; 0,10	1	1,1 ^{R/NP}	0,18 \pm 0,09 ^{NP}	NP
B	27	SAB	0,60; 0,30; 0,30; 0,10; 0,40; 0,60; 0,20; 0,00	2	2,5 ^{R/NP}	0,59 \pm 0,08 ^{NP}	NP
B	28	SABL	0,60; 0,20; 0,40; 0,50; 0,50; 0,30; 0,20; 0,30	3	3 ^{R/NP}	0,19 \pm 0,03 ^{NP}	NP

Tabela 4 (continuação) – Comparação dos resultados entre o RPT e o MAT (A e B) em relação a avaliação da contaminação pirogênica nos lotes de Soros Hiperimunes de diferentes fabricantes.

Produtor	Lotes	Amostras	Varição individual de temperatura	Animais* ≥0.5°C	RPT (Σ ΔT)** (°C)	MAT (UEE/ml)a	MAT b
B	29	SAR	0,50; 0,30; 0,40; 0,10; 0,10; 0,20; 0,20; 0,30	1	2,1 ^{R/NP}	2,34 ± 0,06 ^{NP}	NP
B	30	SABL	0,20; 0,10; 0,60; 0,10; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40	1	2 ^{R/NP}	2,34 ± 0,05 ^{NP}	NP
B	31	SABL	0,30; 0,20; 0,60; 0,00; 0,10; 0,20; 0,30; 0,30	1	2 ^{R/NP}	3,08 ± 0,05 ^{NP}	NP
A	32	SAEL	0,50; 0,20; 0,10; 0,10; 0,10; 0,30; 0,00; 0,10	1	1,5 ^{R/NP}	2,66 ± 0,02 ^{NP}	NP
A	33	SAB	0,00 ; 0,60 ; 0,00; 0,20; 0,40; 0,10; 0,20; 0,20	1	1,7 ^{R/NP}	0,12±0,05 ^{NP}	NP
B	34	SABL	0,30; 0,50; 0,10; 0,20; 0,50; 0,30; 0,30; 0,50	3	2,7 ^{R/NP}	4,65 ± 0,37 ^{NP}	P
B	35	SAB	0,40; 0,40; 0,50; 0,00; 0,10; 0,00; 0,10; 0,00	1	1,5 ^{R/NP}	4,53 ± 0,20 ^{NP}	P
B	36	SAT	0,80; 0,10; 0,50; 0,30; 0,00; 0,10; 0,20; 0,60	3	2,6 ^{R/NP}	5,47 ± 0,34 ^P	P
B	37	SAB	0,10; 0,50; 0,10; 0,10; 0,10; 0; 0; 0,40	1	1,3 ^{R/NP}	5,92 ± 0,51 ^P	P
A	38	SAR	0,30 ;0,10; 0,60; 0,10; 0,15; 0,00; 0,10; 0,00	1	1,35 ^{R/NP}	5,3 ± 0,08 ^P	P
A	39	SAE	0,35; 0,00; 0,50; 0,20; 0,45; 0,05; 0,10; 0,2	1	1,85 ^{R/NP}	5,8 ± 0,32 ^P	P
A	40	SAE	0,35; 0,00; 0,50; 0,20; 0,45; 0,05; 0,10; 0,3	1	1,85 ^{R/NP}	5,4±0,23 ^P	P
A	41	SABL	0,30; 0,40; 0,70; 0,50; 0,50; 0,40; 0,50;0,60	6	3,9 ^{R/P}	6,22 ± 0,46 ^P	P
A	42	SABL	0,30; 0,70; 0,50; 0,30; 0,50; 0,60; 0,40;0,40	4	3,7 ^{R/P}	6,08 ± 0,44 ^P	P
A	43	SAR	0,75; 0,30; 1,05; 0,30; 0,40; 0,30; 0,40; 0,65	3	4,15 ^{R/P}	7,2±0,95 ^P	P

NP = Não Pirogenica, R/NP = Repetição/ Não Pirogênica, R/P = Repetição/Pirogênica. * Critério da Farmacopeia em relação ao número de animais: até 3 animais (NP); ≥ 4 (P). ** Critério da Farmacopeia em relação ao Somatório (S) da Variação Individual de temperatura (VIT) ≥ 3,3 °C. O Método A. Os valores são médias de três replicatas com Desvio Padrão (D.P.). b Método B. Foi considerado 5 UE/mL como controle positivo de endotoxina Os valores são médias de três replicatas com Desvio padrão (D.P.) SAT (Soro antitetânico), SAB (soro antibotrópico), SAR (Soro antirrábico), SAC (Soro anticrotálico); SABL (Soro antibotrópico laquético), SAE (Soro anti-escorpiônico) e SAEL (Soro anti-elapídico)

Para investigar a diferença encontrada entre o Método A e B nas duas amostras de rotina (lotes 34 e 35, **Tabela 4**), 5 lotes de SAB estéreis e apirogênicos (Fabricante A), foram

contaminados artificialmente com 5 UEmL⁻¹ de Endotoxina (**Tabela 5**). Os lotes A e E foram aprovados no MAT pelo método A, embora os valores tenham ficado próximos a 5UEmL⁻¹, e reprovadas no método B ratificando o que foi encontrado na **Tabela 4**. Esta comparação entre os métodos deve ser melhor investigada em estudos posteriores, já que existem poucos dados na literatura que comparem os dois métodos para os mesmos lotes de qualquer substância injetável.

Tabela 5 – Resultados do MAT pelos Métodos A e B em amostras de SAB contaminadas artificialmente com endotoxina na dose limite de 5 UEmL⁻¹. Resultados diferentes entre os métodos estão destacados em negrito.

Lote	MAT (IL-1 β)		MAT (IL-6)	
	Metodo A UEEm ⁻¹	Método B \leq 5UEmL ⁻¹	Metodo A UEEm ⁻¹	Método B \leq 5UEmL ⁻¹
A	4,136\pm 0,28^{NP}	P	4,904 \pm 0,035^{NP}	P
B	5,373 \pm 0,25 ^P	P	5,934 \pm 0,07 ^P	P
C	5,264 \pm 0,16 ^P	P	5,254 \pm 0,127 ^P	P
D	5,423 \pm 0,31 ^P	P	5,654 \pm 0,043 ^P	P
E	4,956\pm 0,13^{NP}	P	5,823 \pm 0,021 ^P	P

^a Método A. Os valores são medias de três replicatas com D.P.

^b Método B. Foi considerado como limite 5 UEmL⁻¹ de endotoxina. Os valores são medias de três replicatas com D.P.

NP = Não pirogênico

P = Pirogênico

4.3.1 Capacidade de predição do MAT para os soros hiperimunes: sensibilidade, especificidade e exatidão

As **Tabelas 6 e 7** mostram a frequência da concordância e discordância dos resultados obtidos *in vivo* e *in vitro* nas amostras de soros hiperimunes da rotina. Podem ser observadas diferenças entre o método A e B em relação ao número de falso-positivos, isto é, produtos classificados como não pirogênicos *in vivo* e pirogênico *in vitro* como discutido anteriormente. Entre os 43 produtos, apenas cinco foram considerados falso positivos para o Método A e 7 para o Método B. Este resultado pode ter ocorrido devido a uma maior sensibilidade do MAT em relação ao RPT para detectar a contaminação.

Conforme observado tanto nas amostras reais da rotina, quanto nas contaminadas artificialmente, a diferença de resultados entre o método A e B para alguns lotes pode ser devido ao ajuste da curva padrão de endotoxina no método quantitativo (Método A). A UEE foi obtida a partir da DO de uma curva padrão de endotoxina, processo diferente do método B onde o resultado foi qualitativo, ou seja, a liberação de citocinas (pg/mL) estava abaixo ou acima da resposta do controle positivo. Esse ajuste da curva do método A depende da inclinação da mesma, e em função desse ajuste os resultados quando transformados para UEE (previsão) podem ser modificados.

Tabela 6 – Tabela de contingência. Comparação dos resultados do MAT/ Método A em relação ao RPT considerado como método padrão (ouro)

		<i>in vivo</i>	
		Pirogênico	Não Pirogênico
<i>In vitro</i>	Pirogênico	3 (a)	5 (b)
	Não pirogênico	0 (c)	35 (d)

a = número de amostras para as quais o RPT e MAT são positivos (verdadeiros positivos), b = número de amostras para as quais o RPT é negativo e o MAT é positivo (falsos positivos), c = número de amostras que o RPT é positivo e o MAT é negativo (falsos negativos), d = número de amostras que o RPT e MAT são negativos (verdadeiros negativos).

Tabela 7 – Tabela de contingência. Comparação dos resultados do MAT/ Método B em relação ao RPT considerado como método padrão (ouro)

		<i>In vivo</i>	
		Pirogênico	Não-Pirogênico
<i>In vitro</i>	Pirogênico	3 (a)	7 (b)
	Não-pirogênico	0 (c)	33 (d)

a = número de amostras para as quais o RPT e MAT são positivos (verdadeiros positivos), b = número de amostras para as quais o RPT é negativo e o MAT é positivo (falsos positivos), c = número de amostras que o RPT é positivo e o MAT é negativo (falsos negativos), d = número de amostras que o RPT e MAT são negativos (verdadeiros negativos).

A partir destes resultados, puderam ser calculados os parâmetros de sensibilidade e especificidade para os dois métodos em relação ao RPT das 43 amostras utilizadas na rotina. Pode ser observado na **Tabela 8**, que foi encontrada 100% de sensibilidade para ambos os métodos (A e B). Portanto, o MAT foi capaz de detectar todos os casos de produtos considerados pirogênicos no RPT. Devido as diferenças entre os métodos A e B, houve uma diferença nos resultados falsos positivos onde foram encontrados 87,5% e 82,5% de especificidade, respectivamente. Schindler e cols. (2006) durante o processo de validação do sangue criopreservado também observaram diferenças em relação a sensibilidade dos dois métodos (Método A 96,7% e B 90,7%) embora apresentassem a mesma especificidade (100%).

Também foram analisados parâmetros como exatidão que se refere à concordância entre os resultados do MAT ao teste de referência no caso RPT, tanto positivos quanto negativos. A concordância entre o MAT e o RPT foi de 88,3% e 83,7% para o método A e B, respectivamente. Estes resultados foram submetidos a revista TOXICOLOGY IN VITRO e o manuscrito disponível no ANEXO B.

Tabela 8 – Valores de sensibilidade, especificidade e exatidão dos métodos A e B do MAT

Parâmetro	MAT (%)	
	Método A	Método B
Sensibilidade	100	100
Especificidade	87,5	82,5
Exatidão	88,3	83,7
Falso Negativos	0	0
Falsos Positivos	11,6	16,3

4.4 APLICABILIDADE DO MAT NA DETECÇÃO DE ZYMOSAN

Para testar a aplicabilidade do MAT para outros tipos de contaminação foi realizada a comparação entre o RPT e o MAT utilizando o Zymosan A e o controle negativo. O MAT foi realizado em sangue criopreservado para IL-1 β e IL-6 pelo Método A, e utilizado o mesmo *pool* para todas as análises. O LD para este lote de sangue criopreservado, foi de 0,034 e 0,040 UEmL⁻¹ respectivamente, para IL-1 β e IL-6.

Na **Tabela 9** são apresentados os resultados do RPT e MAT. No RPT a concentração 1.000 ng/mL/kg de Zymosan foi considerada apirogênica após o primeiro teste no qual nenhum animal mostrou variação de temperatura $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$. Por outro lado, quando os coelhos receberam 2.500 ng/mL de Zymosan os resultados foram duvidosos, uma vez que um dos animais apresentou variação de temperatura igual ou superior a $0,5^{\circ}\text{C}$ e foi necessário o re-teste, com resultado final apirogênico. Somente a concentração de 5.000 ng/mL/kg apresentou resposta pirogênica para ambos os critérios, uma vez que quatro animais apresentaram temperaturas $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$ (0,6 $^{\circ}\text{C}$; 0,7 $^{\circ}\text{C}$; 0,7 $^{\circ}\text{C}$ e 0,5 $^{\circ}\text{C}$) e a soma de oito animais foi $\geq 3,3^{\circ}\text{C}$ (ou seja, 3,8 $^{\circ}\text{C}$). Portanto nos coelhos o limite de febre para o Zymosan foi de 5.000 ngmL⁻¹. No MAT as concentrações de 2.500 e 5.000 ngmL⁻¹ foram consideradas pirogênicas, ratificando os resultados encontrados para os soros hiperimunes em relação a sensibilidade do MAT.

Tabela 9 – Comparação dos resultados entre o RPT e o MAT (IL-1 e IL-6) para Zymosan A. Resultados do MAT foram expressos em UEEml⁻¹. Os valores da MAT são as médias de três replicatas ± (D.P.).

Zym ng/mL	RPT (°C)	RPT ($\sum \Delta T$) (°C)	MAT (IL-1 β) (UEEmL ⁻¹) ^a	MAT (IL-6) UEEml ⁻¹) ^a
CNeg*	0,0; 0,0 ;0,1	0,1 ^{NP}	0,045±0,02 ^{NP}	0,042 ± 0,01 ^{NP}
1000	0,40; 0,30; 0,30	1,00 ^{NP}	3,73 ± 1,55 ^{NP}	3,96 ± 1,4 ^{NP}
2500	0,30; 0,40; 0,50; 0,30; 0,40; 0,40; 0,00; 0,30	2,60 ^{R/NP}	5,46 ± 2,27 ^P	6,01 ± 0,82 ^P
5000	0,60; 0,30; 0,70; 0,30; 0,70; 0,30; 0,40; 0,50	3,80 ^{R/P}	9,74 ± 2,97 ^P	11,72 ± 2,07 ^P

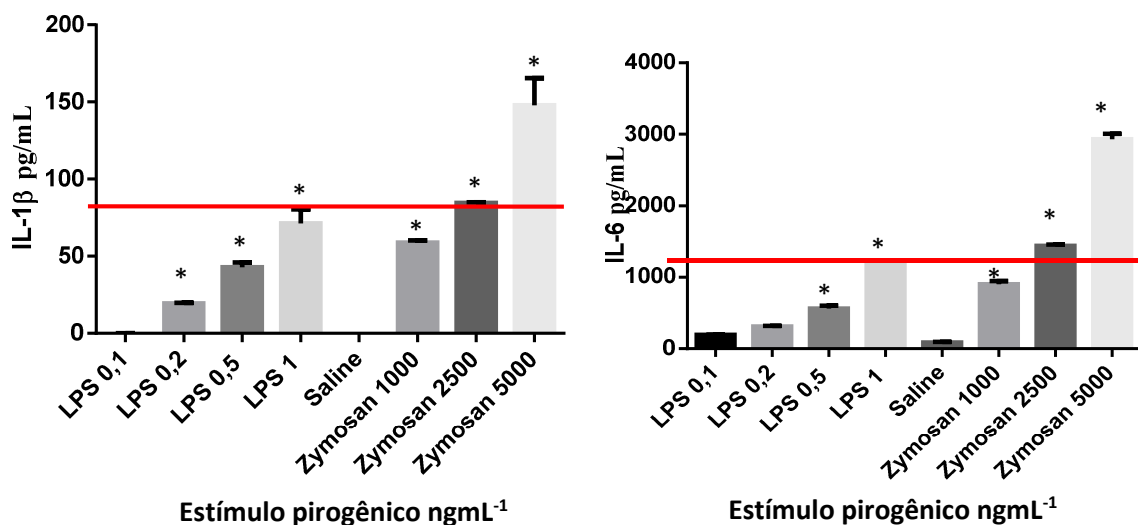
^a Os valores são medias de três replicatas ±D.P.

* Controle negativo de salina apirogênica

NP = Não Pirogênica; P = Pirogênica; R = Repetição

A **Figura 17** mostra a curva de liberação de citocinas do Zymosan em relação a curva de Endotoxina. Pode ser observado que a dose de 2500 ngkg⁻¹ equivale ao controle positivo de 1 ngmL⁻¹ (5UEmL⁻¹). Foi encontrada uma diferença estatística significativa entre as concentrações e em relação à menor concentração de 0,1 ngmL⁻¹ para IL-1 β e 0,2 ngmL⁻¹ para IL-6. O sangue quando estimulado com as mesmas concentrações de endotoxina liberou uma quantidade maior de IL-6 do que IL-1 β . Os resultados desta parte do estudo foram submetidos para avaliação na revista ALTEX e o manuscrito está disponível no ANEXO C.

Figura 17 – Resposta de liberação de IL-1 β (a) e IL-6 (b), frente a diferentes concentrações de Zymosan no sangue criopreservado. A linha representa o ponto de corte de LPS a 1 ngmL⁻¹ (5 UE mL⁻¹) de E. coli O55: B5, o que corresponde ao controle positivo. Média de 3 experimentos independentes (± D.P). *estatisticamente diferente em relação a menor concentração de 0,1 ngmL⁻¹ e entre si ($p \leq 0,05$).



4.5 APLICABILIDADE DO MAT PARA DETECTAR PIROGÊNIOS EM AMOSTRAS DE AR DE LABORATÓRIOS E ESCRITÓRIOS DO INCQS COMPARANDO COM A ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS MESMOS AMBIENTES.

O MAT também foi testado como uma nova aplicação na detecção de pirogênios no ar ambiente em comparação ao método microbiológico atualmente utilizado para este tipo de avaliação. Para a contagem de fungos, assim como a medição da atividade pirogênica pelo MAT foram selecionados cinco locais do INCQS, três representando laboratórios (Lab A, Lab B e Bt) e dois representando salas administrativas (escritórios A e B).

As concentrações dos fungos no ambiente interno e externo, assim como, a umidade relativa do ar e a temperatura nas áreas avaliadas são apresentadas na **Tabela 10**. Verificou-se que a concentração de fungos no ar externo variou 1.350-1.530 UFCm⁻³ em estações mais frias e 673-964 UFCm⁻³ em estações quentes. Os valores externos foram mais elevados no outono e os resultados em ambientes internos seguiram a mesma tendência. Verificou-se que a concentração de fungos em ambientes internos variou 285-825 UFCm⁻³ em estações mais frias e 212-731 UFCm⁻³ em estações quentes. Também pode ser observado que a contagem de fungos foi menor no ar interior do que no exterior, representando 21-53% da concentração externa.

Tabela 10 – Contagem de unidades formadoras de colônias presentes no ar externo e ambientes internos de acordo com diferentes estações do ano.

Locais	Primavera			Verão			Outono			Inverno		
	UFC m ⁻³	UR (%)	Temp (C°)	UFC m ⁻³	UR (%)	Temp (C°)	UFC m ⁻³	UR (%)	Temp (C°)	UFC m ⁻³	UR (%)	Temp (C°)
Externo	873	51,6	26,3	964	73,1	29,7	1530	71	23	1350	62,6	22,3
LabA	235	63,4	20,2	212	63,8	23,1	660**	72,9	19,3	450	62,1	22,5
Lab B	390	63,1	23,1	731**	74,3	22,1	825***	70,3	22,6	535**	74,3	20,5
Bt	230	64,6	22,6	424	61,4	20,2	675**	77,1	22,8	285	61,2	21
EscritA	540**	72,1	21,3	376	63,4	21,5	510**	75,9	21,7	470	67,2	20,9
Escrit B	520**	71,5	22,1	329	60,9	22,2	750***	75,8	20,2	580**	72,1	21,5

UFC m⁻³, Umidade relativa (UR, %) e temperatura (Temp, °C) relacionadas ao dia da coleta

** Valores em ambiente interno acima do recomendado pela WHO e CEC

*** Valores em ambiente interno acima do recomendado pela Anvisa

Quando os resultados foram avaliados e separados por Laboratórios (lab A, B e Bt) e escritórios (Escrit A e B), podemos observar que a média dos escritórios mostrou uma concentração maior de fungos do que os laboratórios, exceto no verão. Talvez pela localização no subsolo do prédio.

Devido à falta de dados sobre limites recomendados para laboratórios e locais de saúde, foi utilizado o relatório da CEC, que considerou para exposições não industriais o valor de 500 UFCm⁻³ como limite moderado de exposição, que é o mesmo valor recomendado pela OMS como limite aceitável para ambiente urbano. O valor máximo de contaminação microbiológica também foi o preconizado pela Anvisa (750 UFCm⁻³ para fungos e uma relação de I/E ≥ 1,5).

Pode-se observar que, 50% do total das amostras apresentou a contagem de fungos acima dos valores recomendado pela OMS e CEC (limiar = 500 UFCm⁻³) e 10% acima do recomendado pela Anvisa (limiar = 750 UFCm⁻³). Quando os resultados foram separados por estações, na primavera 40% das amostras, representadas pelos dois escritórios, apresentou a contagem dos fungos acima do recomendado pela OMS e CEC. No verão somente o laboratório B, apresentou alta contagem de fungos, acima do recomendado pela OMS, CEC e Anvisa. A coleta realizada no outono foi a que apresentou maior contaminação, já que todos os pontos de

coleta obtiveram a contagem de fungos acima do recomendado pela OMS e pela CEC, sendo 40%, representado pelo Lab B e escritório B, acima do recomendado pela Anvisa. Para as amostras coletadas no inverno o laboratório B e o escritório B apresentaram valores acima do recomendado pela OMS e CEC e nenhum local acima dos valores recomendados pela Anvisa.

Além da contagem de fungos, outros parâmetros como umidade relativa e temperatura, também foram avaliados (**Tabela 10**). Os nossos resultados demonstraram que todas as amostras, independentemente da estação possuem umidade relativa maior do que 60% e os resultados indicaram que, quando a umidade relativa for superior a 65% pode estar relacionada ao aumento da contagem dos fungos. As temperaturas das áreas internas estudadas foram consideradas satisfatórias permanecendo entre 20 a 23 °C.

A relação do ar interior/exterior (I/E) para a contagem dos fungos é apresentada na **Tabela 11**. Neste estudo todas as amostras apresentaram valores de I/E menor do que 1,5 que é valor preconizado pela Re 09/2003 da Anvisa, e, portanto, todos os ambientes foram considerados satisfatórios por este critério.

Tabela 11 – Relação I/E para fungos avaliados no INCQS

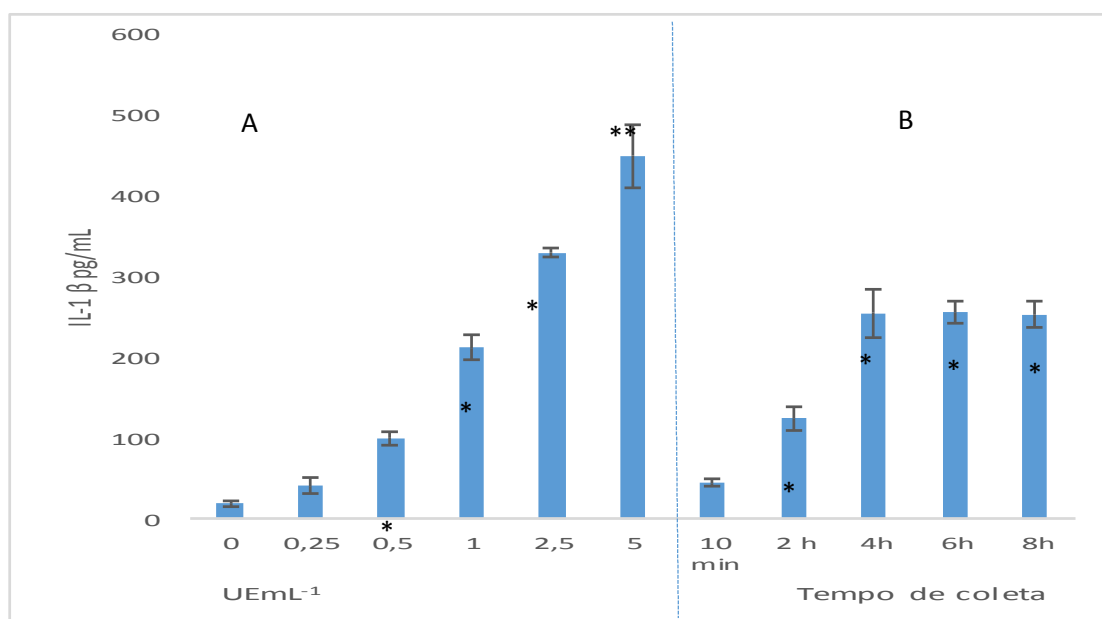
Locais	Primavera (UR 51,6%- 26,3°C)*	Verão (UR 73,1% - 29,7°C)*	Outono (UR 71%- 23°C)*	Inverno (UR 62,6%- 22,3°C)*
lab A	0,34	0,21	0,39	0,43
lab B	0,57	0,77	0,25	0,53
Bt	0,34	0,43	0,21	0,49
escrit A	0,81	0,18	0,34	0,46
escrit B	0,77	0,13	0,42	0,48

*Umidade Relativa (UR%) e temperatura (°C) medidos no momento da coleta

Para avaliar a atividade pirogênica destes locais foi utilizado o MAT com sangue criopreservado e IL-1 β e IL-6 como parâmetros de resposta. Inicialmente a coleta dos filtros seguiu o protocolo de Kindinger et al (2005) que usou o tempo de coleta de 10, 15 e 20 minutos para ambientes contaminados constatando que o valor após 15 minutos de amostragem não é maior do que após 10 minutos. Isto implica que de alguma forma pode haver uma saturação que pode estar relacionada ao potencial de contaminação do local.

Foi necessário, portanto, padronizar o tempo de coleta para ambientes de saúde pela falta de parâmetros anteriores nestas áreas. A atividade pirogênica foi avaliada no MAT variando o tempo de amostragem em 10 minutos, 2, 4, 6 e 8 h em apenas uma sala, no caso o Laboratório (A) para avaliar a diferença de resposta dos filtros através da dosagem de IL1 β (**Figura 18**). Os resultados mostraram que, os valores de IL-1 β aumentaram conforme o tempo de amostragem: 10 minutos, 2 e 4 horas (0,065; 0,367; e 0,63 UEEml⁻¹) atingindo um *plateau* a partir de 4 horas. Isto pode representar uma saturação de resposta das células sanguíneas e, portanto este tempo foi selecionado para a coleta.

Figura 18–Liberação de IL-1 β no sangue total humano (Média) induzida em filtros contaminados artificialmente com LPS e amostras. Média de IL-1 β dos filtros contaminados com LPS (0,25 a 5 UEmL⁻¹(A, n=3 \pm D.P.). Média dos filtros coletados no Laboratório B por 10 min, 2 h, 4 h, 6, e 8 fluxo 1Lmin⁻¹ (B, n=3 \pm D.P.). *p \leq 0,05; p ** \leq 0,01 em relação ao controle negativo (0) (Teste de Mann-Whitney).



Após a determinação do tempo de coleta ideal de quatro horas iniciou-se as coletas dos filtros dos locais amostrados, as quais foram realizadas no mesmo dia da coleta dos fungos. A atividade pirogênica seguiu a mesma tendência da contagem de UFCm⁻³ no que diz respeito a atividade externa e interna. Entretanto, apesar da atividade pirogênica do ar interno ter sido menor do que o ar externo, o ar interno apresentou uma maior variabilidade, representando 14 a 89% da concentração externa (**Tabela 12**). Nas estações mais quentes, a concentração interna representou 16,6-61% da concentração externa quando o parâmetro de leitura foi IL-1 β , e 14-59,4 para IL-6. Nas estações mais frias, esta variabilidade foi maior, representado de 17,5-84% para IL-1 β e 18-89% para IL-6. Os resultados primeiro foram expressos em UEmL⁻¹, onde a média de liberação de IL-1 β ou IL-6 equivalem a resposta do controle positivo de LPS. Os resultados são médias \pm D.P. de 3 replicatas.

Tabela 12 – Atividade pirogênica (UEEm⁻³) em amostras coletadas no ponto externo, e nos pontos internos, laboratórios e escritórios.

Locais	Primavera		Verão		Outono		Inverno	
	IL -1 β UEEmL ⁻¹	IL -6 UEEmL ⁻¹	IL -1 β UEEmL ⁻¹	IL -6 UEEmL ⁻¹	IL -1 β UEEmL ⁻¹	IL -6 UEEmL ⁻¹	IL -1 β UEEmL ⁻¹	IL -6 UEEmL ⁻¹
Externo	2,83±0,01	3,87±0,02	4,12±0,07	4,32±0,05	6,15 ± 0,03	6,41 ± 0,03	2,46 ± 0,05	3,23 ± 0,06
Lab A	1,03 ± 0,02	1,26±0,02	2,2±0,22	2,21±0,02	2,16 ± 0,09	2,49 ± 0,07	0,55 ± 0,01	1,10 ± 0,01
Lab B	1,04±0,05	1,24±0,04	2,67±0,23	2,67±0,06	5,07 ± 0,06	5,7 ± 0,05	1,48 ± 0,1	1,71 ± 0,03
Bt	0,47±0,03	0,42±0,09	2,45±0,02	2,45±0,01	1,65 ± 0,02	2,24 ± 0,13	0,42 ± 0,05	0,59 ± 0,15
Escrit A	1,40±0,01	1,26±0,07	2,57±0,11	2,57±0,02	2,41 ± 0,01	2,08 ± 1,38	1,34 ± 0,12	1,70 ± 0,05
Escrit B	1,05±0,01	1,11±0,08	2,46±0,1	2,46±0,04	5,17 ± 0,02	4,68 ± 0,04	1,71 ± 0,01	1,71 ± 0,06

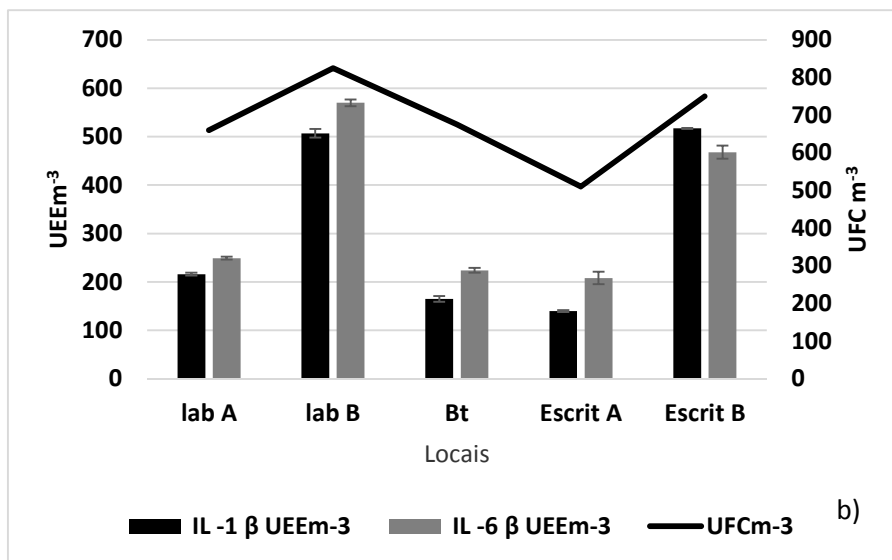
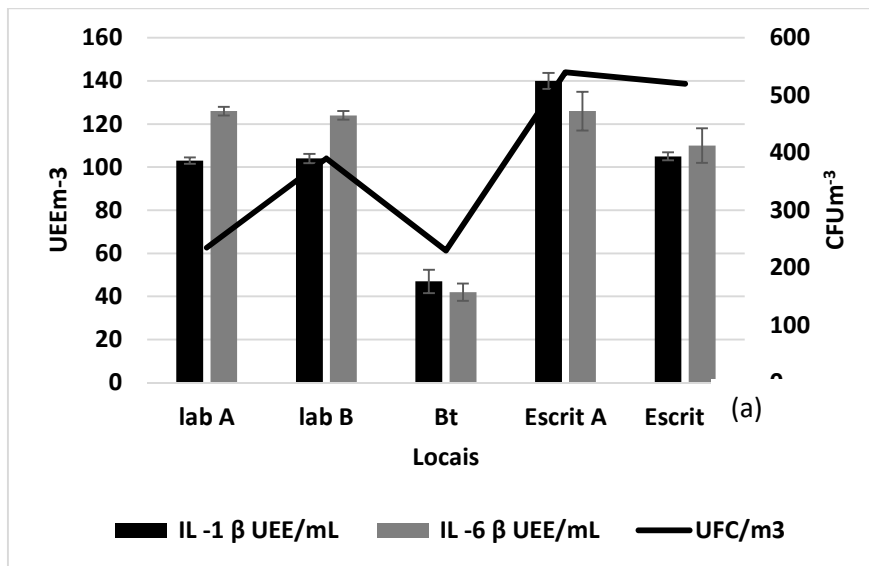
Verificou-se que a atividade pirogênica exterior variou de 2,46 a 6,15 UEEmL⁻¹ para IL-1 β e de 3,23 a 6,41 UEEmL⁻¹ para IL-6 em estações frias; e de 2,83 a 4,12 mL⁻¹ para a IL-1 β e de 3,87 a 4,32 UEE mL⁻¹ para a IL-6 em estações quentes. Os resultados do ar interior variaram de 0,16 a 5,17 UEEmL⁻¹ para IL-1 β ; e de 0,49 a 5,7 UEEmL⁻¹ para a IL-6 em estações frias; e de 1,03 a 2,67 UEEmL⁻¹ para IL-1 β ; e de 1,1 a 2,67 UEEmL⁻¹ para a IL-6 em estações quentes. Os valores mais elevados foram registrados no outono, seguindo a mesma tendência da concentração de fungos. Quando se considerou o valor 0,5 UEmL⁻¹ como controle positivo, 70% das amostras permaneceram acima deste limite, exceto o Bt e o escritório A na primavera para IL-1 β e IL-6 e o Bt para IL-1 β em o inverno.

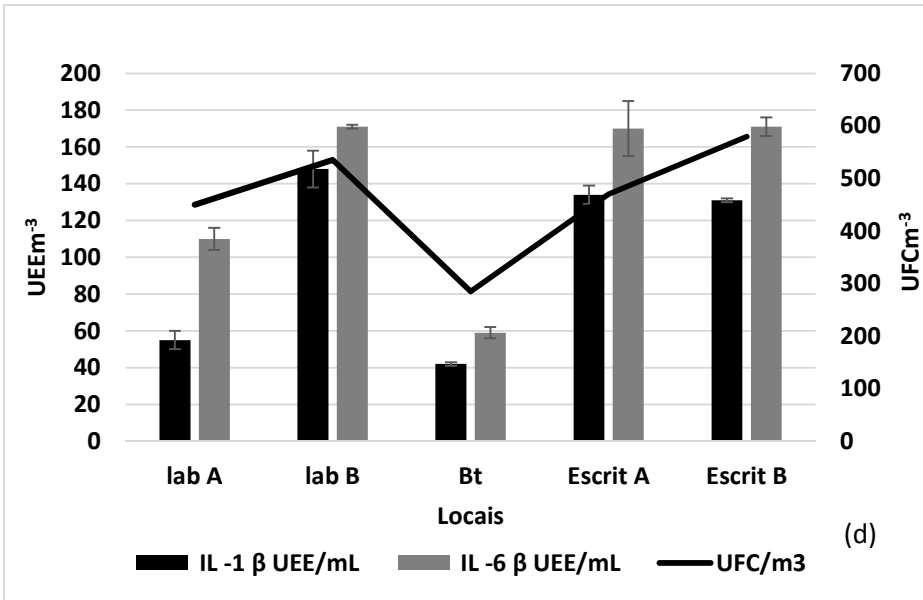
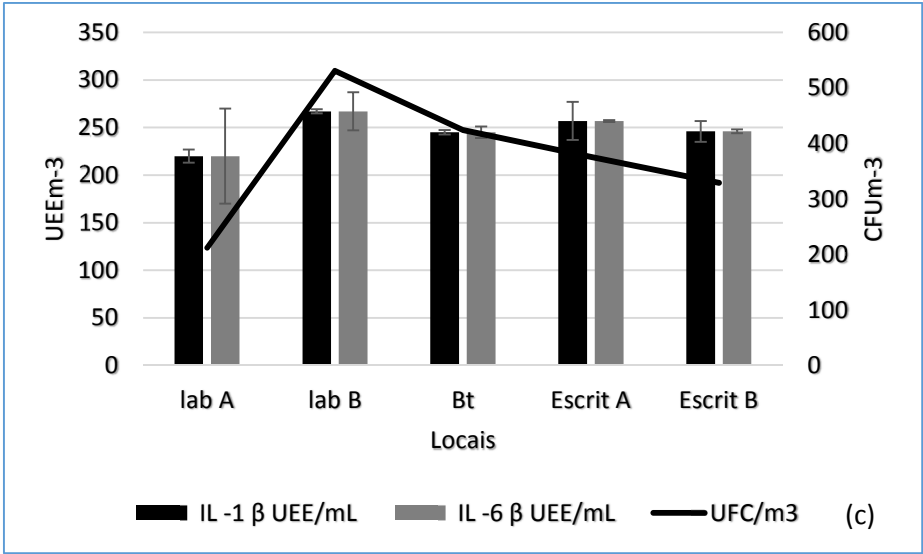
Quando os resultados foram avaliados separados por Laboratórios (A, B e Bt) e Escritórios (A e B), podemos observar que a IL-1 β mostrou resultados equilibrados entre os pontos amostrados: primavera 3,93 e 1,22 UEEmL⁻¹, verão 2,44 e 2,58 UEEmL⁻¹ outono 3,10 e 3,78 UEEmL⁻¹ e no inverno e 2,81 e 1,32 UEEmL⁻¹, respectivamente, para labs e escritórios. Para IL-6, a média nos escritórios foi um pouco superior nos laboratórios com exceção do outono: primavera 0,97 e 1,18 UEEmL⁻¹, 2,44 e 2,58 verão UEEmL⁻¹, outono 3,47 e 3,38 UEEmL⁻¹ e inverno 0,81 e 1,70 UEEmL⁻¹, respectivamente, para laboratórios e escritórios.

Os resultados também foram transformados para m^3 de ar para facilitar a comparação com estudos anteriores. A **Figura 19** resume a atividade pirogênica com IL-1 β e IL-6 (UEEm^{-3}) e a contagem de fungos (UFCm^{-3}). Apesar da mesma tendência, não é possível determinar uma boa correlação entre os mesmos. Os resultados do MAT variaram nas faixas de 103-517 UUEm^{-3} para IL-1 β e 110-570 UUEm^{-3} para IL-6. Quando separados por estações mais frias e quentes, variaram entre 160-517 UEEm^{-3} para IL-1 β e 490-570 UEEm^{-3} para IL-6 em estações frias e 103-267 UEEm^{-3} para IL-1 β e 110-267 UEEm^{-3} para IL-6 em estações quentes. Se 150 UEEm^{-3} proposta por Bernasconi e cols. (2010) como limite para edifícios públicos fosse utilizado para as amostras, mais de 55% dos locais ficariam acima deste limite para IL-1 β e 65% para o IL-6.

Cabe ressaltar, que esta parte do estudo gerou uma publicação intitulada “Avaliação microbiológica da qualidade do ar de interiores: aspectos metodológicos e legais” na revista Universitas (ANEXO D) e os dados desta parte do estudo serão submetidos para avaliação à revista Environmental Monitoring and Assessment (ANEXO E).

Figura 19 – Comparação dos resultados entre a contagem de fungos (UFCm^{-3}) e atividade pirogênica (UEEm^{-3}) levando-se em consideração as variações sazonais. Média da liberação de IL-1 β no sangue total humano induzida em filtros contaminados artificialmente com LPS e amostras: (a) primavera; (b) verão; (c) outono e (d) inverno.





5 DISCUSSÃO

Os testes para a detecção de pirogênios são ensaios de segurança toxicológicos imprescindíveis, tanto nas etapas de produção quanto no controle da qualidade de produtos injetáveis, garantindo a segurança do seu uso e evitando efeitos adversos à saúde. Nosso estudo abordou diversos aspectos da utilização do MAT, que envolveram pelo menos três pontos-chaves levantados pelo ICCVAM, os quais levaram o MAT a não ser considerado um substituto completo do RPT, a saber: i. a falta de dados em relação a produtos biológicos, ii. a falta de comparação em paralelo entre os dados *in vivo* e *in vitro*, e iii. a necessidade de novos estudos comparando os dados *in vivo* com os *in vitro* envolvendo pirogênios não endotoxinas (ICCVAM, 2008).

Para entender a lacuna de dados na literatura apontada pelo ICCVAM em relação a determinadas classes de produtos, foi necessário realizar uma avaliação das monografias dos produtos injetáveis que atualmente usam obrigatoriamente o LAL e principalmente o RPT. Desta forma, foi possível um diagnóstico dos principais produtos não contemplados no processo de validação visando estimular e nortear estudos sobre a aplicabilidade do MAT. Cabe ressaltar, que tanto as Leis brasileiras n° 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 e n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, quanto a diretiva Europeia 2010/63/UE estão firmemente baseadas no princípio dos 3Rs e, desta forma, impõem a substituição dos testes em animais quando existem alternativas validadas, como no caso dos testes de pirogenicidade (BRASIL, 1998, BRASIL, 2008, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2010).

O resultado do levantamento dos produtos nas monografias farmacopeicas, apontou uma grande variedade de produtos que obrigatoriamente devem ser avaliados para a contaminação pirogênica o que se contrapõe ao número restrito de produtos validados internacionalmente no MAT e conseqüentemente dificultando o seu reconhecimento como substituto do RPT. Os dados demonstram que apenas 1 produto, a ampicilina sódica, que apresenta monografia para o RPT e LAL foi validada no MAT. Os produtos que foram validados internacionalmente no MAT são medicamentos de interesse europeu, e que apesar de serem utilizados no Brasil não refletem a demanda específica dos produtos nacionais como no caso dos produtos biológicos. Desta forma, os resultados indicaram de forma clara a importância desta classe de produtos

como ponto de partida para estudos de aplicabilidade do MAT e conseqüentemente o seu reconhecimento como método alternativo visando a substituição do RPT.

Os soros hiperimunes foram apontados pelo levantamento como prioridade em relação aos demais produtos, já que representam quase 70% dos produtos biológicos avaliados obrigatoriamente pelo RPT. Estes soros são considerados de grande interesse para o Ministério da Saúde e possuem grande destaque dentro do contexto epidemiológico sanitário no Brasil, principalmente os antiofídicos, já que tanto a incidência dos acidentes quanto a severidade dos casos permanecem pouco conhecidas. Além disso, a diversidade de espécies de serpentes venenosas existentes no Brasil e sua ampla distribuição geográfica, tornam estes soros altamente específicos e importantes para um tratamento rápido e eficaz (ARAUJO, 2008). O cenário atual em relação ao controle da qualidade da produção de soros hiperimunes é bem diferente do encontrado nas décadas de 1980 e 1990, onde os casos de contaminação eram muito comuns nas três grandes etapas: **i.** produção do plasma, **ii.** produção do concentrado de imunoglobulina e **iii.** envase de ampolas. Um dos pontos de melhoria do processo foi a alteração dos métodos de esterilização que eram feitos por filtração e passaram a ser realizados por radiação ionizante além do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (GUIDOLIN et al, 1988; ARAUJO, 2008). O INCQS, como Laboratório Nacional de Controle, avalia um grande número de soros hiperimunes, e desta forma, uma vez reconhecida a aplicabilidade do MAT para esta classe de produtos, cerca de 650 animais/ano deixariam de ser usados, ratificando os conceitos éticos e reduzindo o custo e prazo das análises.

Apesar das vantagens e reconhecimento do MAT como um potencial substituto do RPT alguns estudos publicados recentemente apontaram possíveis restrições da sua aplicação quando se necessita de uma grande quantidade de sangue por ensaio, assim como o procedimento de coleta do sangue que pode ser considerado invasivo e causar desconforto aos doadores (KORYAKINA; BRUEGGER, 2014, WUNDERLICH; SCHUMACHER; KIETZMANN, 2014). A limitação do uso de grandes quantidades de sangue fresco foi contornada com o processo de criopreservação do sangue total desenvolvido por Schindler e cols. (2004), sendo seu uso validado posteriormente em 2006. Segundo Megha e cols. (2010), a utilização do *pool* de sangue criopreservado de pelo menos 4 doadores é uma alternativa viável, tanto economicamente como experimentalmente, quando comparada ao sangue fresco principalmente quando o uso do sangue é necessário em maiores quantidades.

Quando o processo de criopreservação foi desenvolvido por Schindler e cols. (2004) os autores testaram a reatividade das amostras de sangue de cinco doadores individualmente e combinadas entre si (*pool*), sendo neste último caso, frescas após a adição de DMSO (*pool 1*) e criopreservadas após a descongelamento do sangue (*pool 2*). Os resultados demonstraram que não houve diferença na reatividade dos *pools* de sangue para o desfecho avaliado (IL-1 β), assim como na reação do *pool* do sangue, o qual foi igual à média da reação dos doadores individuais. Desta forma, pode-se ter disponibilidade de amostras de sangue total humano para testes durante pelo menos 4 meses quando criopreservadas a -80°C, e até 1 ano quando criopreservadas em vapor de nitrogênio líquido (SCHINDLER et al, 2004).

Os resultados do nosso estudo corroboraram os encontrados por Schindler e cols. (2004) em relação a resposta de IL-1 β dos doadores individualmente e do *pool* após o descongelamento, onde não foi encontrada diferença estatística significativa entre as respostas após estímulo por endotoxina. Entretanto, nosso estudo também avaliou quinzenalmente a reatividade das amostras de sangue durante todo o processo de armazenamento a -80°C demonstrando que até o final do processo (4 meses) o sangue criopreservado foi capaz de responder ao estímulo de endotoxina. Além disso, foi realizada a contagem das células sanguíneas por tipo celular (granulócitos e agranulócitos) para avaliar o perfil hematológico dos doadores e do *pool* durante o armazenamento do sangue criopreservado. Os resultados mostraram que o percentual de células mononucleares sofreu uma pequena elevação, demonstrando que, em função da diminuição da contagem geral, os linfócitos/monócitos permaneceram inalterados, por isso, a variação no percentual. Por outro lado, o % de granulócitos foi reduzido durante os dias de congelamento. Segundo Timm e cols. (2008), a criopreservação de granulócitos é um processo mais difícil, especialmente dos neutrófilos, provavelmente devido ao seu elevado grau de granulação. No entanto, para se testar possíveis diferenças estatisticamente significativas serão necessários um maior número de experimentos. Sreelekshmi e cols. (2013) analisaram a influência da criopreservação de leucócitos isolados do sangue total de doadores na resposta de IL-1 β ao LPS e ao ALT. Os resultados demonstraram que as funções fisiológicas e a morfologia das células foram altamente conservadas após a criopreservação no período avaliado (60 dias), e que apesar da redução da viabilidade celular esta não afetou a resposta dos linfócitos aos estímulos pirogênicos. Além disso, os autores concluíram que a diferença do grupo sanguíneo dos doadores não interferiu na resposta de IL-1 β quando utilizado o *pool* de sangue.

O uso de sangue total criopreservado também tem sido aplicado em outras áreas como na área de imunofenotipagem como o apresentado por Nemes e cols. (2015), onde segundo os autores, o processo facilitou as comparações interlaboratoriais e reduziu a infraestrutura laboratorial necessária em comparação ao uso do sangue fresco. Em uma das etapas as subpopulações de células sanguíneas periféricas foram avaliadas por citometria de fluxo em amostras criopreservadas por até dois anos, e foi evidenciado pouca variação na contagem de granulócitos, linfócitos, monócitos, células T, células B e células T ativadas, com coeficientes de variação menores do que 15% para todas as amostras em até um ano de armazenagem a -80°C . Estes dados ratificam os encontrados no nosso estudo, exceto para os granulócitos onde nossos resultados mostraram uma redução no número de células. Entretanto, nossos dados, demonstraram a funcionalidade dos linfócitos e monócitos (medição de IL-1 β), durante os quatro meses de armazenagem a -80°C , da mesma forma que, possíveis variações interindividuais demonstraram não afetar a resposta de um *pool* a endotoxina. Os dados também mostraram que o sangue criopreservado libera maior quantidade de citocinas do que o fresco conforme também encontrado em estudos anteriores (MEGHA et al, 2010).

Recentemente, dois estudos apresentaram a utilização de outras fontes de células mononucleares (WUNDERLICH et al, 2014; KORYAKINA; BRUEGGER, 2014) para contornar a necessidade de se obter maiores quantidades de sangue quando necessário, embora a utilização de sangue total humano criopreservado tenha minimizado esta questão. O primeiro foi um estudo conduzido por Wunderlich e cols. (2014), o qual sugere a utilização do sangue bovino no lugar do sangue humano para o MAT. Segundo os autores, o uso do sangue bovino evitaria possíveis contaminações e a influência de fatores relacionados a genética e estilo de vida dos doadores humanos, já que os animais poderiam ser livres de patógenos e mantidos em ambientes apropriados. Entretanto, os resultados encontrados demonstraram que o sangue bovino foi menos reativo e menos sensível do que o sangue humano principalmente para os NEPs testados (ALT e peptidioglicano). Os autores utilizaram kits de interleucina humana, já que, os leucócitos bovinos são semelhantes aos humanos, entretanto, ressaltaram que a falta de kits para ELISA para a determinação de citocina bovina pode ter prejudicado as análises. Cabe ressaltar, que existe uma discussão ética em relação aos 3Rs já que os animais não seriam aqueles usados para abate e, sim, mantidos para sangria. Além disso, já existe o modelo usando sangue humano, validado internacionalmente, e, o uso do sangue de animais por mais próximo que seja ao do homem, pode retornar ao problema de extrapolação de dados entre espécies, que é um dos alvos de críticas ao RPT.

A outra opção foi proposta por Koryakina e cols. (2014) sobre o desenvolvimento de um processo de criopreservação de PBMC originadas de filtros leucocitários que podem aumentar a disponibilidade de células mononucleares para ensaios em escala industrial, além de evitar o desconforto da coleta do sangue (flebotomia). Segundo os autores a utilização destes filtros, normalmente tratados como bio-resíduos em hospitais e centros de doação de sangue, é uma forma de se evitar a manipulação de sangue humano fresco nos laboratórios de nível de biossegurança 2. Outras opções poderiam ser a utilização do *buffy coat* (fração de uma amostra de sangue após centrifugação em gradiente de densidade, que contém a maioria dos glóbulos brancos e plaquetas) de bolsas de sangue e que também são tratados como bio-resíduos, assim como outras partes plásticas contendo sangue total humano que são desprezadas após a coleta (KORYAKINA; BRUEGGER, 2014).

Portanto, o MAT usando o *pool* do sangue criopreservado foi utilizado para as demais etapas do estudo que incluíram: i. a aplicabilidade do MAT para soros hiperimunes, ii. para o Zymosan e iii. na detecção de pirogênicos em amostras de ar. Portanto, o próximo passo foi avaliar a aplicabilidade do MAT para os soros hiperimunes analisados na rotina pelo RPT no INCQS, assim como alguns lotes contaminados artificialmente. Primeiramente foi realizado o teste de interferentes para o SAB, onde foi observado uma variabilidade no percentual de recuperação independente do fator de diluição, ou seja, nem sempre diluições maiores apresentaram percentual de recuperação maiores a um fator de diluição menor. Cabe ressaltar que esta variação pode ser intrínseca ao teste, já que se espera uma recuperação de 50 a 200%. Dados semelhantes foram encontrados por Perdomo-Morales e cols. (2011) para albumina sérica humana (HSA), incluindo os valores de recuperação superiores a 200% para IL-6 conforme também encontrado nos soros hiperimunes. Essa variabilidade também foi encontrada pelos autores para o LALc incluindo percentuais de recuperação acima de 100% dependendo do fator de diluição utilizado. Os resultados do nosso estudo demonstraram percentuais de recuperação de Endotoxina acima de 100% a partir das amostras diluídas 1:10. Presgrave (2003) avaliou pela primeira vez o uso do MAT utilizando sangue fresco para soros hiperimunes (SAB, SAT e SAR) concluindo que o método foi reprodutível, desde que diluído 1:10, com a finalidade de eliminar a interferência pela morte celular, podendo ser aplicado aos diversos tipos de produtos injetáveis sujeitos à ação de Vigilância Sanitária. Portanto, tanto o sangue fresco como o criopreservado devem ser utilizados na MinDV de 1:10 para amostras de soros hiperimunes. Fíngola e cols. (2013) determinaram esta mesma diluição para o LAL pelo

método cromogênico cinético para o SAB, apesar dos cálculos da MDV serem diferentes entre ambos (LAL e MAT).

Os resultados avaliados em paralelo entre o MAT (IL-1 β) e o RPT demonstraram que o MAT apresentou boa sensibilidade e especificidade na detecção de pirogênios para os lotes de soros hiperimunes analisados, e portanto, demonstrou um bom desempenho na detecção da contaminação em situações reais. Qualquer decisão sobre critérios específicos para níveis aceitáveis de sensibilidade e especificidade em uma dada situação envolve a relação entre amostras não detectadas (falso negativos) contra aquelas classificadas "erroneamente" como pirogênicas (falso positivos). Neste caso, não houve resultados falsos negativos já que o MAT apresentou 100% de especificidade. Os resultados positivos no MAT, de alguns ensaios RPT negativos após segundo ensaio, mostraram que o MAT foi capaz de detectar a contaminação na dose limite que o coelho não pode detectar. Isso pode ser explicado pela variação biológica intrínseca do modelo animal, que é um dos problemas da comparação *in vivo* e *in vitro*. Portanto, quando o RPT apresentou resultados positivos ou negativos (primeiro ensaio), o MAT teve os mesmos resultados nos dois métodos independentemente do método utilizado ser o A ou o B. No entanto, quando o RPT apresentou resultados para repetição, ou seja, duvidosos, o MAT apresentou resultados discordantes em alguns casos. Houve uma diferença na detecção entre os métodos A e B para duas amostras que passaram após o segundo ensaio do RPT e foram insatisfatórias apenas no método B. Então, algumas questões podem ser levantadas em relação ao método B, ou seja, se apesar de ser um ensaio qualitativo este método demonstrou ser mais sensível detectando a contaminação, enquanto que o A, talvez pelo ajuste da curva, não conseguiu detectar. Ou se o método A, por ser quantitativo, foi mais preciso classificando as amostras em relação ao RPT com melhor concordância do que o B. Mesmo quando estes dados foram reproduzidos artificialmente em 5 lotes de SAB, a diferença entre os métodos pode ser demonstrada em 40 % das amostras para IL-1 β e não sendo observado para IL-6. Cabe ressaltar que Schindler e cols., (2006) descreveram problemas em relação a reprodutibilidade interlaboratorial de 1 dos 3 laboratórios envolvidos no processo de validação por captura do sangue criopreservado para o Método B. Devido a problemas de ordem técnica de um dos laboratórios, das 48 amostras analisadas pelo método A, somente 37 amostras foram analisadas satisfatoriamente pelo método B. Esta diferença reduziu a sensibilidade do Método B (90,5%) em relação ao A (96,7%). A diferença entre os métodos A e B deve ser melhor investigada em estudos posteriores ampliando a análise de lotes contaminados artificialmente com endotoxina. Também foi encontrado em nosso estudo maior resposta para IL-6 do que para IL-1 β ,

ratificando estudos anteriores que apresentaram esta mesma tendência para amostras de HSA na presença de Endotoxina (PERDOMO-MORALES, 2011).

Existem poucos estudos publicados que avaliaram em paralelo o MAT e o RPT e que podem ser usados comparativamente aos dados do nosso estudo (**Quadro 7**). Entretanto, assim como os nossos resultados do MAT para soros hiperimunes, todas as publicações anteriores indicaram que o MAT é um método alternativo sensível e que pode substituir o RPT principalmente para produtos biológicos.

Quadro 7 - Principais publicações que utilizaram dados em paralelo ao RPT, MAT e/ou LAL

Referência	Produto	Estímulo	Testes aplicados
Spreitzer e cols. (2002)	HSA	LPS	RPT e MAT com sangue humano fresco
Schindler e cols. (2003)	NaCl 0,9%	LPS ALT	MAT com sangue humano fresco e MAT com sangue de coelho fresco
Perdomo Morales e cols. (2011)	HSA	LPS	RPT, LALc e MAT com sangue criopreservado
Fingola e cols. (2013)	Soros Hiperimunes	LPS	RPT e LALc

O primeiro estudo foi conduzido por Spreitzer e cols. (2002) onde foram avaliados em paralelo o RPT e o MAT para HSA. Os resultados apresentados demonstraram a sensibilidade do MAT na detecção de contaminação em 100% das amostras de albumina contaminadas artificialmente com a dose limite quando comparadas ao RPT. Schindler e cols. (2003) compararam o uso do MAT em sangue humano e em sangue de coelho para IL-1 β e IL-8, sendo que, apenas o sangue humano liberou IL-1 β assim como apresentou maior reatividade do que o sangue de coelho para IL-8. Em outro estudo conduzido por Perdomo-Morales e cols. (2011) o RPT, o MAT e o LAL foram avaliados paralelamente para amostras de HSA, onde, segundo os autores o MAT possui uma alta correlação com RPT e pode ser utilizado com segurança para avaliação de preparações de HSA e outros produtos que contenham proteínas.

Um estudo apresentado por Fíngola e cols. (2013), comparou o LALc e o RPT para SAB, e concluiu que o método foi considerado válido para a determinação de endotoxina bacteriana em SAB diluído 1:10, a mesma diluição utilizada no MAT. Entretanto, cabe ressaltar, que apesar da grande importância do LAL na detecção de endotoxinas, estudos anteriores concluíram que o LAL não foi adequado para amostras biológicas como por exemplo para preparações de HSA apesar de ser o método preconizado na FA (SPREITZER et al, 2002; PERDOMO-MORALES et al, 2011). Perdomo-Morales e cols. (2011) identificaram que a principal fonte de contaminação de produtos derivados do sangue são os (1,3)- β -glicanos, comumente obtidos a partir de filtração com membranas de celulose. Essas moléculas também são um dos componentes mais abundantes da parede de leveduras. Como a cascata do LAL é desencadeada por (1,3)- β -D-glicanos e polissacarídeos, esse teste pode apresentar resultado falso positivo quando estas moléculas estiverem presentes. Portanto, os autores concluíram que nem o RPT nem o LAL foram suficientemente confiáveis para garantir a segurança dos consumidores, apesar do LAL ser preconizado para este tipo de análise. Problemas com a recuperação de endotoxina no LAL também foram documentados em estudos anteriores demonstrando sua ineficácia para produtos biológicos (HOCHSTEIN et al, 1990, JÜRGENS et al, 2002, PERDOMO-MORALES et al, 2011). Segundo Schindler e cols. (2009) o LAL não deve ser considerado como um substituto do RPT uma vez que negligencia a potencial presença de outros pirogênios.

Enquanto o MAT não for reconhecido pelos órgãos regulatórios como um substituto completo ao RPT, a redução do uso de animais dentro dos conceitos dos 3Rs deve ser considerada. Apesar da grande importância da redução do número de animais, atualmente a Lei 11.794/2008 não permite a reutilização de animais, embora a FB preconize a reutilização dos coelhos no RPT exceto para os produtos biológicos, devido ao risco de reação cruzada (WILLIAN et al, 2007, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A diretiva Europeia 2010/63/UE (artigo 16) permite a redução do número de animais embora baseada no seu sistema de classificação dos testes em leves, moderados e severos. Desta forma, o sistema de classificação impôs restrições ao reuso para limitar as pesquisas e fazer com que os animais passem pelo mínimo de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro e que assim também possam ser proporcionados resultados mais próximos ao objetivo da pesquisa. Por este sistema o RPT é considerado um teste de dor leve e portanto a reutilização é permitida (HARTUNG et al, 2010). Freitas e cols. (2011) propuseram a redução do número de animais através da

reutilização dos coelhos para soros hiperimunes em até quatro vezes por semana, sem interferência na resposta (FREITAS, 2011).

Portanto, os resultados desta etapa do nosso estudo demonstraram a aplicabilidade do MAT no controle da qualidade dos soros hiperimunes, sendo considerado um teste sensível e específico para ser utilizado com segurança para avaliação da contaminação pirogênica destes produtos. Outros estudos realizados para produtos biológicos como albumina humana indicaram a substituição do RPT pelo MAT como teste final para liberação de lotes de albumina, e provavelmente também para outros produtos derivados do sangue e proteínas terapêuticas.

Uma outra questão levantada pelo ICCVAM que dificultou o reconhecimento do MAT como um substituto do RPT, foi a aplicabilidade do teste para NEPs como o Zymosan. Portanto, amostras contaminadas artificialmente com Zymosan foram comparadas no MAT (IL-1 β e IL-6) e no RPT e demonstraram a capacidade do MAT em responder a pirogênios não endotoxinas, conforme também encontrado por Lopes (2014) para o ALT. Segundo Lopes (2014) a dose limite que causa febre nos animais foi estabelecida em 75.000 ngKg⁻¹ sendo equivalente 50.000 ngmL⁻¹ ou 5,41 UEE mL⁻¹ de ALT no MAT. Além disso, LALc (*end point*) não foi reativo para as concentrações de 100 e 1.000 ng/mL de ALT testadas e apresentou resultados falso-reativos a partir de 10.000 ng/mL. Os resultados encontrados por Lopes (2014) em relação ao LAL ratificam os descritos na literatura, na qual fica claro que componentes imuno-estimulatórios derivados principalmente de bactérias Gram-positivas e fungos foram negativos no LAL sem resultar em nenhum tipo de reação. Além disso, existe uma diferença na detecção de diferentes tipos de endotoxina pelo LAL e a produção de efeitos pirogênicos causados em células imunes de origem humana (MORATH et al, 2002, BRANDENBURG et al, 2009; STODDARD et al., 2010). No nosso estudo foi detectada a resposta de febre dos coelhos ao Zymosan na dose de 5.000 ngkg⁻¹ e do MAT em 2.500 ngml⁻¹ demonstrando maior sensibilidade em relação ao RPT. Os dados encontrados no nosso estudo com o Zymosan seguiram a mesma tendência aos encontrados no ALT por Lopes (2014) onde o MAT demonstrou ser mais sensível quando comparado ao RPT, o que também foi descrito por Hasiwa e cols. (2013). Os fungos, em geral, provaram ser altamente reativos no MAT, apesar de existirem diferenças entre cepas. Daneshian e cols. (2006) utilizaram o MAT para avaliar a atividade pirogênica de esporos fúngicos a partir de mais de 44 fungos filamentosos patogênicos e não patogênicos diferentes, assim como, leveduras. Nesta abordagem, o MAT provou ser um sistema adequado para avaliar o potencial

pirogênico de contaminações fúngicas, refletindo diretamente a reatividade humana (DANESHIAN et al, 2006, HASIWA et al, 2013).

Nosso estudo também abordou outras aplicações do MAT, em novas áreas, como no controle da qualidade do ar ambiente. Os resultados apresentados demonstraram que o MAT é capaz de detectar contaminação em ambientes de saúde, em relação aos estudos já descritos na literatura, onde o MAT foi aplicado em locais como uma fazenda e Edifícios públicos. Apesar da necessidade de estudos com um maior número de amostras e por um maior período de tempo em relação as variações sazonais, os resultados ratificaram estudos anteriores onde o outono foi a estação com a maior concentração de fungos (BURGE et al, 2000; MENEZES et al, 2004, GRAUDENZ et al, 2005, ZIHE et al, 2014).

A umidade relativa (UR) do ar é um importante parâmetro de conforto térmico e consequentemente de avaliação da qualidade do ar. Nos Estados Unidos, a resolução nº55/1994, da ASHRAE (sigla do inglês *American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers*) recomenda a manutenção da umidade relativa do ar entre 30 e 60 por cento, e alerta que acima deste valor, fungos podem se tornar um problema para a saúde humana (WHO, 2009). Pasanen e cols (1991) constataram que a temperatura entre 21-30°C e a umidade relativa de 75-92% podem induzir um crescimento rápido de fungos. Portanto, considera-se que os bioaerossóis aumentam mais facilmente em áreas com clima úmido e quente (PONCE-CABALLERO et al, 2010). A resolução 09/2003 da Anvisa estabeleceu que entre 40 e 65% no verão e 35 e 65% no inverno como faixa operacional ideal.

Os resultados também indicaram que o aumento de concentrações externas de fungos resultou num aumento correspondente das concentrações internas na maioria dos locais conforme também indicado em estudos anteriores (PONCE-CABALLERO et al 2010, ZIHE et al, 2014). No Brasil, pela RE 09/2003 quando a relação I/E é superior a 1,5 um diagnóstico das fontes de poluição deve ser feito e as medidas corretivas implementadas. No entanto, os valores, maiores que 1 indicam que as partículas encontradas no interior existem em maior quantidade do que no ar exterior. Ponce-Caballero e cols (2010) consideraram ideal a relação I/E para fungos menor ou igual a 1, já que este valor indica um equilíbrio entre as partículas encontradas no interior com as encontradas no exterior. Neste estudo a relação I/E foi menor do que 1 em todos os pontos avaliados independente da estação do ano.

A análise determinada pela contagem de fungos demonstrou que 50% do total das amostras ficou acima do recomendado pela OMS e CEC (Limiar = 500 UFCm⁻³) e 10% acima

do recomendado pela Anvisa (limiar = 750 UFCm⁻³). Para a atividade pirogênica, 70% das amostras permaneceram acima do controle positivo 0,5 UEmL⁻¹ de *E. coli*. Estudos anteriores utilizaram o mesmo controle positivo usado para produtos injetáveis (0,5 UEmL⁻¹) para amostras de ar, já que a membrana mucosa do pulmão tem 100 m² e que sua alta capacidade de absorção das substâncias inaladas faz com que os efeitos causados pela administração intravenosa destas mesmas substâncias sejam equivalentes (KINDINGER et al, 2005).

Quando os dados foram avaliados separadamente por estação, a contagem de fungos demonstrou uma variabilidade, ficando acima do limite por exemplo em 20 % das amostras no verão e 100% no outono. No MAT, o índice de contaminação, de uma forma geral, foi maior onde apenas a sala do Biotério na primavera e no inverno apresentou baixa contaminação em relação ao controle positivo de 0,5 UEmL⁻¹. A falta de valores de referência, assim como a falta de métodos de amostragem padronizados faz a comparação de dados existentes difícil de ser aplicada, e mais estudos são necessários para estabelecer valores de referência para os locais de saúde e assim como, a realização de mais amostras durante todo o ano e por vários anos para relacionar estes valores às variações sazonais.

Um dos pontos avaliados neste estudo foi a determinação do tempo de coleta de ar para avaliação da atividade pirogênica. Os resultados de liberação de IL-1 β atingiram um plateau a partir de 4 horas, que também foi encontrado em estudos anteriores (KINDINGER, et al, 2005, BERNASCONI et al, 2010). Segundo Kindinger e cols. (2005) isto pode ser resultado da saturação dos filtros, das células do sangue, ou da detecção no ELISA. Bernasconi e cols. (2010) utilizaram o MAT para a avaliação da atividade pirogênica em prédios públicos por 4, 6, 8 e 24 horas para avaliar a tendência de contaminação durante o dia. Para as coletas pontuais os autores utilizaram 4 e 8 horas, para os ambientes externo e interno respectivamente. No ambiente externo a partir de 4 horas foi observada a saturação dos filtros. Estas diferenças devem ser melhor avaliadas em estudos posteriores para a determinação de uma legislação que leve em consideração os diferentes níveis de contaminação dos ambientes assim como nível de contaminação dependendo da natureza de cada local.

Os resultados do MAT também foram comparados em relação a contagem de fungos. Apesar de mostrarem a mesma tendência não foi possível determinar uma correlação entre eles conforme também indicado em estudos anteriores por Bernasconi e cols. (2010). Os resultados do MAT variaram nas faixas de 103-517 UUEm⁻³ para IL-1 β e 110-570 UUEm⁻³ para IL-6. No entanto, não há dados de medidas comparáveis disponíveis, já que o MAT até agora foi aplicado

para investigar atividade bioaerosol em ambientes muito contaminados como criações de pato ($7,5 \times 10^3$ a $3,8 \times 10^5$ UUEm⁻³) e estábulos ($0,1$ a 16×10^6 UUEm⁻³) (KINDINGER et al, 2005, ZUCKER, SCHARF, KERSTEN, 2006, BERNASCONI et al, 2010). Os dados mais próximos são em edifícios públicos onde Bernasconi e cols. (2005) demonstraram que em 95% deles, os níveis de atividade pirogênica não excederam 150 UUEm⁻³, sendo 102-104 vezes mais baixo do que os locais contaminados citados anteriormente e, portanto este limite poderia ser utilizado para avaliação da atividade pirogênica (BERNASCONI et al, 2005). Comparando nossos resultados da contagem de fungos, nos quais 50% das amostras permaneceram acima do limite da OMS e CEC, e 10% acima do limite da Anvisa, com os resultados encontrados no MAT pode ser observado que se o limite de 150 UUEm⁻³ fosse aplicado 55% dos locais ficariam acima deste limite para IL-1 β e 65% para o IL-6. Isto pode ser esperado uma vez que o MAT detecta a carga biológica do ambiente e não só os fungos viáveis.

Os dados do nosso estudo deixaram claro que apenas a contaminação fúngica no ar não é suficiente para a avaliação completa da qualidade do ar. Alguns fatores devem ser considerados como a diferença de potência do estímulo imune dos microrganismos variar de espécie para espécie, de nem todas as bactérias crescerem em placas de agar padrão, além de terem tempos de crescimento diferentes o que significa que a carga biológica do ambiente avaliado nas determinações por UFC podem ser negligenciados. Desta forma, o MAT deve ser indicado para complementar a contagem de fungos ambientais e contribuir para uma adequada avaliação da qualidade do ar.

Os resultados do nosso estudo indicam o MAT como uma alternativa para o RPT, detectando endotoxina, outros pirogênicos e misturas (bioaerossóis e poeira). O uso do sangue total humano é um modelo de detecção precoce ao aparecimento da febre humana e reflete as reações do sistema imune inato melhor do que os outros dois métodos (RPT e LAL) e, portanto, permite uma previsão mais real da contaminação pirogênica. O modelo do MAT já usa substrato humano, portanto, o uso de sangue humano diminui as variações na comparação e fidelidade ao mecanismo de ação, já que, não necessita de extrapolação entre espécies. Os resultados do MAT utilizando sangue de coelho (SCHINDLER et al, 2003) e bovino (WUNDERLICH et al, 2014) considerados inferiores e menos sensíveis que o ensaio com uso do sangue humano ratificam este fato. Portanto, este estudo demonstrou que, embora o MAT não permita qualquer conclusão sobre o tipo de contaminante presente na amostra (assim como os demais ensaios para detecção de pirogênicos), ele pode refletir a forma que o organismo reagiria ao

contaminante contribuindo para uma maior segurança na liberação dos lotes avaliados no controle da qualidade dos produtos sujeitos a vigilância sanitária.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que os produtos biológicos são a principal classe de medicamentos injetáveis que requerem testes de pirogenicidade principalmente o RPT, e que portanto, devem ter sua aplicabilidade no MAT testada. Os soros hiperimunes devido a sua importância no contexto sanitário epidemiológico e por representarem 70% dos produtos biológicos que passam exclusivamente pelo RPT foram selecionados como ponto de partida para o estudo.

Foi demonstrado que o processo de criopreservação não afeta a contagem de linfócitos/monócitos e que a redução após sete dias na contagem geral de células brancas está relacionada à diminuição dos granulócitos. Da mesma forma, o uso do *pool* não interferiu na resposta do sangue ao LPS nas condições avaliadas, minimizando variações interindividuais entre os doadores.

Foi constatado que o MAT pode ser aplicado para a detecção de Endotoxina nos soros hiperimunes apresentando sensibilidade e especificidade adequadas em relação ao RPT, tanto nas amostras de rotina quanto nas contaminadas artificialmente. Da mesma forma, o MAT foi mais sensível do que o RPT na detecção de amostras contaminadas artificialmente com Zymosam.

O MAT também pode ser utilizado em novas áreas e apresentou bons resultados na detecção de pirogênios em amostras de ar ambiente de locais com baixo potencial de contaminação, entretanto, outros estudos devem ser realizados para avaliar a relação entre valores de referência de contaminantes no ar e possíveis efeitos a saúde, assim como o mecanismo de ação dos pirogênios no tecido pulmonar. De qualquer forma, o MAT pode ser utilizado como um método complementar ao microbiológico contribuindo para uma melhor avaliação QAI.

Este estudo pode contribuir inicialmente para inclusão do MAT na Farmacopeia Brasileira para a avaliação de pirogenicidade de soros hiperimunes e servir de base para que o BraCVAM e outras instituições internacionais possam indicá-lo aos órgãos reguladores como um substituto completo ao RPT.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; Lichtman, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, p. 499-511, 2004.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.6, n.1, p.158-170, 2003

ANDRADE, S. et al. Comparative evaluation of the human whole blood and human peripheral blood monocyte tests for pyrogens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 265, p. 115-124, 2003.

ANVISA. **Resolução n º 09, de 16 de Janeiro de 2003**. Orientação Técnica sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. Revisão e atualização da RE/Anvisa nº 176, de 24 de outubro de 2000. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Brasília, DF, 20 Jan 2003.

ARAÚJO, H. P. **Avaliação de metodologia oficial in vivo e desenvolvimento de metodologia de inibição da citotoxicidade in vitro para a determinação de potência de soro antibotrópico**. 2008. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2008

BERNASCONI, C.; et al. Pyrogenic activity of air to characterize bioaerosol exposure in public buildings: a pilot study. **Letters in applied microbiology**, v.50, n.6, p. 571 – 577, 2010.

BICEGO K. C.; BARROS R. C.; BRANCO L. G. Physiology of temperature regulation: comparative aspects. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**.v.147, n.3, p. 616-39, 2007.

BLAAUBOER, B. J. The contribution of in vitro toxicity data in hazard and risk assessment: current limitations and future perspectives. **Toxicology Letters**, v. 180, p. 81–84, 2008.

BONETTA, S. et al. Assessment of microbiological indoor air quality in an Italian office building equipped with an HVAC system. **Environmental Monitoring and Assessment**. v.16; n.1 (1-4), p.473-83, 2010.

BOUILLARD, L. et al. Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.12, p.187–192, 2005.

BRANDENBURG, K.; HOWE, J.; GUTSMAN, T.; GARIDEL, P. The expression of endotoxic activity in the Limulus test as compared to cytokine production in immune cells. **Curr Med Chem**, v.16, n.21, p. 2653-60, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, de 20 de setembro de 1990, Brasília, Brasil: República Federativa do Brasil.

_____. Lei n. 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, de 13 de fevereiro de 1998, Brasília, Brasil: República Federativa do Brasil.

_____. Lei nº 9782 de 26 de janeiro de 1999. Dispõe sobre a definição do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, de 27 de janeiro de 1999, Brasília, Brasil: República Federativa do Brasil.

_____. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001, 120 p.

_____. **Decreto Nº 4.725, DE 9 de Junho de 2003.** Aprova o Estatuto e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções Gratificadas da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 09 jun. 2003. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2003/d4725.htm>. Acesso em: 03 jan. 2014.

_____. Ministério da Saúde. **Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos especiais.** Brasília, 2006. p.112

_____. Ministério da Saúde. **Normas técnicas de profilaxia da Raiva Humana.** Brasília, 2011. p.60

_____. Ministério da Saúde. **Difteria: aspectos clínicos e epidemiológicos.** Brasília, 2014.p.62. Disponível em http://www.vigilanciaemsaude.ba.gov.br/sites/default/files/vigilancia_epidemiologica/imunop_reveniveis/arquivo/2014/05/26/Apresenta%C3%A7%C3%A3o_VE_Difteria_Maced%C3%B4nia_16052014.pdf. Acesso em 22 fev 2015.

_____. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 09 out. 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm>. Acesso em: 02 jul 2012.

BURGE, H. A. et al. Dynamics of airborne fungal populations in a large office building. **Curr Microbiol** v.40, n.1, p.10-6, 2000

CALDEIRA, C. et al. Microbiological evaluation of indoor air quality: legal and methodological aspects. **Universitas: Ciências da Saúde**, v.10, n.1, p. 51-60, 2012.

CASTRO, H. A. et al. Study of the interleukin 1 and 6 and tumorous necrosis factors in workers exposed to silica. **Cadernos de Saúde Coletiva**, n.13 v.4, p.785 - 798, 2005.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Biological Particles in Indoor Environments**, Report 12, Luxembourg, Sweden: 1993, p.80.

_____. Protection of animals used for scientific purposes. Council Directive 2010/63/EU, 2010. Disponível em :
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF>

_____. Sixth Report on the Statistics on the number of animals used for Experimental and Scientific Purposes in the Member States of the European Union. ComMission Staff working Document. Brussels, 2010.45 p.

COSTA, E. A.; Rozenfeld, S. 2000. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: Rozenfeld, S. (org). Fundamentos da Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.

CRUZ-MACHADO, S. S. Lipopolissacarídeo (LPS): Ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF-kB. **Revista da Biologia**, v.4, p. 40-43, 2010.

DA SILVA A. C. P. 2000. O Laboratório Oficial na avaliação analítica. In: Rozenfeld S (org). Fundamentos da Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.

DANESHIAN, M., et al. In vitro pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs. **J Immunol Methods**, v. 313, p. 169-175, 2006.

DANESHIAN, M.; Von AULOCK; HARTUNG, T. Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay. **Nature Protocols.**, v. 4, n.12, p.1709 -1721, 2009.

DINARELLO C. Endogenous pyrogens. **Methods in Enzymology**; v.163:p.495-510, 1988.

_____. A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **Journal of Endotoxin Research**. v.10, n.4, p.201-22, 2004.

DRAIN, C. et al. Cytokine induction by Gram-positive bacteria. **Immunobiology**. v. 213, p. 285-296, 2008.

DUVERNOY, H. M.; RISOLD, P. Y. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. **Brain Res Rev**. v. 56, n.1p.119-47, 2007
endotoxin. **J. Immunol. Methods**, v. 194, n. 2, p. 121-129, 1996.

EPERON, S. et al. T W 1997. Human monocytoïd cell lines as indicator of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and *Limulus* amoebocyte lysate assay. **J. Immunol. Methods**; 207(2):135-145.

EPERON, S.; JUNGI, T. W. The use of human monocytoïd lines as indicators of endotoxin. **J. Immunol. Methods**; v.194, n.2, p.121-129, 1996.

EUROPEAN Pharmacopoeia. Monocyte Activation Test. General Method 2.6.30. 6th Edition, Suppl. 6.7; 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA Pirogênios. In: FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: Anvisa, 2010b. v.1, p. 229-230.

FIGUEIREDO, R. T.; CARNEIRO L. A. M.; BOZZA, M. T. Fungal Surface and Innate Immune Recognition of Filamentous Fungi. **Frontiers in Microbiology**; v.2: n.248, p.1 -9, 2011.

FINGOLA, F. F. et al. Intralaboratory validation of kinetic chromogenic *Limulus* amebocyte lysate assay for bacterial endotoxin determination in anti-biothropic serum. **J Pharm Biomed Anal.** v.5, p. 93-8, 2013

FREITAS, J. C. B. R. **A reutilização de coelhos submetidos ao teste de pirogênio com produtos biológicos sujeitos à Vigilância Sanitária.** 2008. 60p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

FREITAS, J.C.B.R. et al. The re-use of rabbits in pyrogen testing (RPT) of hyperimmune sera and vaccines contributes to the reduction of animal use. **ALTEX**, Linz, v. 28, Special issue, p. 23, 2011.

FUKUMORI, N. T. O. **Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em radiofármacos pelo método de formação de gel: validação.** 2008. 77f. Dissertação (Mestrado)–Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GRAUDENZ, G. S. et al. Association of air-conditioning with respiratory symptoms in office workers in tropical climate. **Indoor Air** v.15, n.1, p.62-6, 2005.

GUIDOLIN, R. et al. Esterilização de soros e vacinas por radiação gama de cobalto. **Rev. Saúde Pública** v.22, p.113-117, 1988.

HANSEN, E. W.; CHRISTENSEN, J. D. Comparison of cultured human mononuclear cells, *Limulus* amebocyte lysate and rabbits in the detection of pyrogens. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 15, n. 6, p. 425-33, 1990.

HARTUNG T, WENDEL, A. Detection of pyrogens using human whole blood. **In Vitro Toxicol.**; v.9, n.4, p. 353-359, 1996.

HARTUNG T. Comparative analysis of the revised Directive 2010/63/EU for the protection of laboratory animals with its predecessor 86/609/EEC - a t4 report. **ALTEX** v. 27, n.4, p.285-303, 2010.

HARTUNG, T. et al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. **ATLA**, v.29, p.99-123, 2001.

HASIWA, N. et al. T4 Report: Evidence for the Detection of Non-Endotoxin Pyrogens by the Whole Blood Monocyte Activation Test. **ALTEX**. v. 30. N.2, p. 169-208, 2013.

HOCHSTEIN, H. D; MUNSON, T. E; OUTSCHOORN, A. S. Comparison of rabbit responses of two *E. coli* endotoxin preparations in the FA rabbit pyrogen test. **Pharmacopeial Forum**, p. 346-351, 1990.

HOFFMANN, S. et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. **J Immunol Methods**. v. 298, n.1-2, p.161-73, 2005.

HOU, W. et al. Viral infection triggers rapid differentiation of human blood monocytes into dendritic cells. **Blood**, n. 29; v.119, p. 3128–3131, 2012.

INCQS. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE. Atividades institucionais 2005-2008. Rio de Janeiro, 2009. 107p.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **ICCVAM test method evaluation report**: Validation status of five *in vitro* test methods proposed for assessing potential pyrogenicity of pharmaceuticals and other products. 2008. (NIH publication, n. 08-6392). Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/pyrogen/TMER/PyroTMER2008.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2012.

KINDINGER, I. et al. A new method to measure air-borne pyrogens based on human whole blood cytokine response. **J Immunol Methods**; v. 298, n.1-2, p.143-53, 2005.

KORYAKINA, A.; FREY, E.; BRUEGGER, P. Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test. **J Immunol Methods**; v. 405, p.181-91, 2014

LAFLAMME, N.; RIVEST, S. Toll-like receptor 4: The missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. **FASEB Journal**, v.15, p.155-163, 2001.

LAUDE-SHARP, M. et al. Dissociation between the interleukin 1-inducing capacity and Limulus reactivity of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria. **Cytokines** v.2, n.4, p.253-8, 1990.

LIEBER, S.V. et al. Standardization of whole blood assay for determination of pyrogenic activity inorganic dust samples. International. **Journal of Hygiene Environmental Health** v. 212, p.547–556, 2009.

LIMA, G. M. S. Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus Thuringiensis*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vol. 7, p.119-137, 2010.

LOPES, I. G. **Avaliação do teste de ativação de monócitos na determinação da contaminação pirogênica com ácido lipoteicoico em produtos injetáveis**. 2014. 73p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

MAGALHÃES, P. O. et al. Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: a Review. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.10, n.3, p.388-404, 2007.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**; v. 388 (6640), p. 394-397, 1997

MEGHA, K. B.; SIDDHARTH BANERJEE, MOHANAN P.V. Investigation of interleukin-1b release from cryopreserved blood stimulated with endotoxin. **Cryobiology** v. 63, p. 273–278, 2011.

MELANDRI, V. et al. Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de produtos injetáveis sujeitos à Vigilância Sanitária. **Universitas: Ciências da Saúde**. v. 8, n. 2, p. 69-95, 2010.

MORATH, S., et al. T. Structural Decomposition and Heterogeneity of Commercial Lipoteichoic Acid Preparations. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 938–944, 2002.

NAKAGAWA, Y.; MAEDA, H.; MURAI, T. Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 3, p. 588- 597, 2002.

NEMES E.; et al. Differential leukocyte counting and immunophenotyping in cryopreserved ex vivo whole blood. **Cytometry A.**; v. 87, n.2, p.157-65, 2015.

NUNES, Z. G. et al. Indoor air microbiological evaluation of offices, hospitals, industries, and shopping centers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 351-357, 2005.

OGOINA, D. Fever, fever patterns and diseases called 'fever'--a review. **Journal of Infection and Public Health**.n.4, v.3, p.108-24, 2011

ORTIZ, G. et al. A Study of Air Microbe Levels in Different Areas of a Hospital. **Current Microbiology**, n.59, p. 53–58; 2009.

PANTOJA, L. D. M., COUTO, M. S., PAIXÃO, G. C. Diversidade de Bioaerossóis Presentes em Ambientes Urbanizados e Preservados de um Campus Universitário. **Biológico**, v.69, n.1, p.41-47, 2007.

PASANEN, A. L. et al. Laboratory studies on the relationship between fungal growth and atmospheric temperature and humidity. **Environment International**, v.17, p.225- 228, 1991.

PASQUARELLA, C; PITZURRA, O.; SAVINO A. The Index of Microbial Air Contamination. **Journal of Hospital Infection** v. 46, p.241-256, 2000.

PEARSON, F. C. **Pyrogens Endotoxins, LAL Testing and Depyrogenation**. New York, NY: Marcel Dekker, p. 214, 1985.

PERDOMO-MORALES, R. et al. Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin. **ALTEX**, v.28, n.3, p. 227-35. 2011

PEREIRA, R.G. et al. Bioaerossóis bacterianos em um hospital. **Revista de Ciências Farmacêuticas**. Básica e Aplicada, v. 26, n. 1, p. 77-81, 2005.

PINTO, T. J. A; KANEKO, T. M; OHARA, M. T. Pirogênio e endotoxinas Bacteriana. In: **CONTROLE biológico de qualidade de produtos farmacêuticos**, correlatos e cosméticos. 3. ed. São Paulo Atheneu,. p. 497-542, 2010

PONCE-CABALLERO, C. et al. Indoor-outdoor fungal-aerosols ratios of domestic homes in Merida, Mexico. *Ingeniería* v. 14, n.3, p. 169-175, 2010. Disponível em <http://www.revista.ingenieria.uady.mx/volumen14/indoor.pdf>

POOLE, S. et al. Assay of pyrogenic contamination in pharmaceuticals by cytokine release from monocytes. **Dev. Biol. Stand**, v. 69, p. 121-123, 1988.

PRESGRAVE, O. A. F. MÉTODOS ALTERNATIVOS. IN: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIÁ, V. G. M.; KO, G. M. (ORG.). **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu editora, 2009.

_____. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis**. 2003. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2003.

QUADROS, M. E. et al. Indoor air quality in hospitals: a case study and a critical review of current standards. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n.3, p. 431-438, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*, 3 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 692P, 1997.

SATO, S., et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor- 3, in the Toll-like receptor signaling. **J Immunol**, v. 171, p. 4304-10, 2003.

SCHINDLER S.; et al. Comparison of the Reactivity of Human and Rabbit Blood towards Pyrogenic Stimuli. **ALTEX**, v. 20, n.2, 2003.

_____. Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity test. **J Immunol Methods**, v. 294, p.89-100, 2004.

_____. Development, validation and applications of the Monocyte Activation Test for pyrogens based on human whole blood. **ALTEX**, v.26, p.265-277, 2009.

SCHINDLER, S.; SPREITZER, I.; LOESCHNER, B. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. **J.Immunol. Methods**, v. 316, p. 42-51, 2006.

SEO, H. S.; MICHALEK, S. M.; NAHM, M. H. Lipoteichoic Acid Is Important in Innate Immune Responses to Gram-Positive Bacteria. **Infection and Imunity**, v.76.n.1, p.206-213, 2008.

SINITOX, Rio de Janeiro, Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox>. Acesso em 15 ago. 2014

SPREITZER, I. et al. Comparative Study of Rabbit Pyrogen Test and Human whole Blood Assay on Human Serum Albumin. **ALTEX** v.19, n. 1102, 2002.

SREELEKSHMI R. N., GEETHA, C. S. AND MOHANAN; P.V. Analysis of IL-1 β Release from Cryopreserved Pooled Lymphocytes in Response to Lipopolysaccharide and Lipoteichoic Acid. **BioMed Research International**, v.1, p.1-10, 2013.

STODDARD, M. B., PINTO, V., KEISER, P. B., AND ZOLLINGER, W. Evaluation of a whole-blood cytokine release assay for use in measuring endotoxin activity of group B *Neisseria meningitidis* vaccines made from lipid A acylation mutants. **Clin. Vaccine Immunol.** , v. 17,p. 98-107, 2010.

TAKTAK, Y. S. et al. Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. **Journal of Pharmacy Pharmacology**.; v.43, p.578-582. 1991

TAPPING, R. I. et al. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides. **J Immunol.** v.15; n.165 (10), p.5780-7, 2000.

THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v. 41, p. 541-557, 2003.

VAURE, C.; LIU Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. **Front. Immunol**, v. 10; online. Disponível em

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00316/full>. Acessado em 08/03/2015.

Van DUIN, D.; MEDZHITOV, R.; SHAWEMAIL, A. C. 2006 Triggering TLR signaling in vaccination. **Trends in Immunology**, v. 27, p. 49-55, 2006

WILLIAMS, L. K. **Endotoxins. Pirogens: LAL Testing and Depyrogenation**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Programmes and projects: Guidelines for indoor air quality: dampness and mould**, 2009. Disponível em: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0017/43325/E92645.pdf. Acessado em 01 de Agosto de 2010.

WUNDERLICH, C.; SCHUMACHER, S.; KIETZMANN, M. Pyrogen detection methods: Comparison of bovine whole blood assay (bWBA) and monocyte activation test (MAT). **BMC Pharmacology and Toxicology**, v.15, p.50-57, 2014.

ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. et al. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. **International Journal of Cancer**, v. 41, n. 3, p. 456-61, 1988.

ZIHE, E.M.; FERNANDES R.B.; MACEDO, M.R.V., VIEIRA V.M.; MORAES, A.M.L. Determination of air fungal contamination in public kindergartens in Rio de Janeiro/ RJ. **Vigilância Sanitária em Debate**; v.2, n.1, p.51-56, 2014.

ZUCKER, B.A., SCHARF, P. AND KERSTEN, C. Determination of the inflammatory potential of bioaerosols from a duckfattening unit by using a limulus amoebocyte lysate assay and human whole blood cytokine response. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, n.53, p. 176–180, 2006.

ANEXO A ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO– VISA EM DEBATE

Aplicabilidade do Teste de Ativação de Monócitos (MAT) no Brasil: importância da sua utilização como teste para detecção de pirogênios no controle da qualidade de produtos injetáveis

Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) in Brazil: the importance of its use as a test for detection of the pyrogens in the quality control of injectable products

Running title: Importance of MAT in the quality control of injectable

Título corrido: Importância do MAT no controle da qualidade de injetáveis

Caldeira C^{1,2}, Cruz M¹, Freitas J¹, Presgrave O^{1,2}, Moraes A³, Delgado I¹.

¹ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

² Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM INCQS/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

³ Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

RESUMO

O MAT (sigla do inglês *Monocyte Activation Test*) é considerado um potencial substituto do Teste de Pirogênios, entretanto: *i.* não foi avaliado para um número suficiente de produtos; *ii.* faltam dados que possam garantir sua capacidade em detectar pirogênios não endotoxinas; e *iii.* deve ser realizada a validação do método para cada classe de produtos. O objetivo foi identificar as monografias que requerem testes de pirogenicidade e propor os produtos que têm por base somente o teste de pirogênios como um ponto de partida para futuros estudos. As monografias específicas nas Farmacopeias Americana, Europeia e Brasileira que recomendam o Teste de Pirogênios ou Teste de Endotoxina Bacteriana ou LAL (sigla do inglês *Limulus Amebocyte Lysate*) foram: Teste de Pirogênios: 20 monografias na Americana, 37 na Europeia e 28 na Brasileira. LAL: 619 monografias na Americana,

157 na Europeia e 41 na Brasileira. Somente 4 produtos requerem testes de pirogenicidade nas três farmacopeias analisadas. O Teste de Pirogênios e LAL são recomendados em 6 monografias na Brasileira e 15 na Europeia. Na Brasileira, a maior parte dessas monografias são referentes a produtos biológicos, sugerindo assim que estes devam ser os primeiros a ser testados, uma vez que são ensaiados em animais.

Palavras-chave: Teste da Ativação de Monócitos – Teste de Pirogênios – Farmacopeias – Produtos Biológicos

ABSTRACT

Monocyte Activation Test (MAT) is thought to be a good replacement for Rabbit Pyrogen Test (RPT), however: I – MAT was not adequately evaluated in a sufficient number of products; II – there is no sufficient data that support the ability to detect Non-Endotoxin Pyrogens; and III – MAT was used subject to validation for each specific product. The aim of this study was to identify in main Pharmacopoeias which monographs require pyrogenicity tests and propose that products for which only the Rabbit Pyrogen test is required to be used as a kick-off study for future studies. Products monographs in United States, European and Brazilian Pharmacopoeias that are recommended for RPT or BET were as following: RPT: 20 Monographs in American, 37 in European and 28 in Brazilian Pharmacopoeias. BET: 619 Monographs in American, 157 in European and 41 in Brazilian. Four products require pyrogenicity in the 3 Pharmacopoeias. RPT and BET are recommended by 6 Monographs in Brazilian and 15 in European Pharmacopoeias. In Brazilian Pharmacopoeia most are biologicals, so, these products should be the first ones to be tested for the applicability to MAT since they are tested mainly by RPT.

Keywords: Monocyte Activation Test – Rabbit Pyrogen Test – Pharmacopoeias – Biological products

Autor para correspondência:

Cristiane Caldeira

Departamento de Farmacologia e Toxicologia – INCQS/FIOCRUZ

Avenida Brasil, 4365 – Manguinhos

21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil

Tel.: (+55-21) 3865-5277

Fax: (+55-21) 2290-0915

E-mail: cristiane.caldeira@incqs.fiocruz.br

INTRODUÇÃO

Todos os produtos injetáveis de uso humano devem ser livres de pirogênios, uma vez que este tipo de contaminação pode ser considerado um grave problema de saúde pública podendo causar desde alterações vasculares até um quadro de choque e morte. Portanto, os testes para a detecção de pirogênios são ensaios de segurança toxicológicos imprescindíveis tanto nas etapas de produção quanto no controle da qualidade de produtos injetáveis, garantindo a segurança do seu uso e evitando efeitos adversos à saúde^{1,2}. Existem três métodos utilizados para detectar a presença de pirogênios: o Teste de Pirogênios realizado em coelhos, o Teste de Endotoxina Bacteriana, também conhecido como LAL (sigla do inglês, *Limulus Amebocyte Lysate*) e o Teste de Ativação de Monócitos (MAT, sigla do inglês *Monocyte Activation Test*)².

O Teste de Pirogênios foi primeiramente descrito por Hort e Penfold em 1911 e foi introduzido na Farmacopeia dos Estados Unidos da América (FA) como método oficial em 1942³. Este teste fundamenta-se na observação da resposta febril em coelhos, após injeção intravenosa da solução em análise, na qual se mede a temperatura retal dos animais a intervalos de 30 minutos, por um período de 3 horas. Cabe ressaltar, que a relação dose-resposta é similar entre o homem e coelho, onde 1 ng/kg (5 UE/kg) é a dose mínima que causa febre em ambas as espécies^{2,4}. O Teste de Pirogênios, apesar de ser um ensaio seguro por detectar um amplo espectro de substâncias e ser aplicável a um grande número de produtos, não pode ser utilizado para algumas classes de medicamentos, como qualquer um que interfira na resposta imune e no mecanismo da febre, como por exemplo, medicamentos analgésicos, antitérmicos e anti-inflamatórios. Além disso, os coelhos são susceptíveis à interferência de fatores relacionados ao ambiente externo como temperatura, ruídos, umidade e ventilação. Fatores relacionados ao animal como diferenças de resposta

entre raças, sexo e a variabilidade biológica também contribuem para possíveis resultados falso-positivos e falso-negativos^{2,5}.

A partir de 1959, com a publicação do livro “The principles of humane experimental technique” foi introduzido no meio científico o conceito dos 3Rs (do inglês *Reduction, Refinement and Replacement*), que consiste na redução do número de animais, refinamento das técnicas experimentais, minimizando o sofrimento do animal e melhorando o seu bem-estar e, quando possível, a substituição dos testes realizados *in vivo* por testes *in vitro*². Desde então, um grande esforço vem sendo realizado na busca por métodos alternativos ao Teste de Pirogênios. Em 1964, Levin e Bang descreveram a reação de coagulação da hemolinfa do caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*) após contato com a endotoxina. Durante a década de 1970, muitos estudos foram realizados com a proposta de utilizar a formação do gel como uma forma de controle para parenterais e o LAL foi incluído como monografia oficial da FA em 1980^{2,5}.

O LAL durante muito tempo foi considerado como um potencial método substitutivo para o Teste de Pirogênios além de ser muito utilizado no controle da produção de água de hemodiálise e diluentes de vacinas. Entretanto, grande parte dos produtos biológicos não pode ser testada neste modelo *in vitro* devido a capacidade da endotoxina de se ligar a proteínas plasmáticas, como por exemplo no caso de produtos biológicos, e não ser detectada, já que o LAL quantifica endotoxina livre, podendo levar a resultados falsos negativos. Além disso, o LAL não pode ser considerado um substituto completo do Teste em Pirogênios por ser um método somente para endotoxina, não sendo capaz de detectar outros pirogênios^{6,7}. Segundo Schindler et al (2009) em contrapartida ao fato da endotoxina ter sido muito investigada nos últimos 50 anos e o LAL amplamente utilizado, as contaminações por Gram-positivas e fungos foram negligenciadas, apesar destas compreenderem a maioria dos formadores de esporos, o que representa um diferencial na contaminação pirogênica⁷.

Em 2005, cinco métodos baseados na liberação de citocinas pró-inflamatórias por monócitos humanos foram validados internacionalmente para medicamentos injetáveis^{8,9,10}, sendo introduzidos como monografia oficial na Farmacopeia Europeia¹¹ com o nome de Teste de Ativação de Monócitos. Estes métodos são: (a) sangue total

humano/Interleucina (IL) 1 β ; (b) sangue total humano/IL-1 β com aplicação do sangue criopreservado, (c) sangue total humano/IL-6, (d) células mononucleares do sangue periférico/IL-6 e (e) linhagem celular Mono Mac 6 (MM6)/IL-6. O uso do MAT foi validado para os seguintes produtos: Cloreto de Sódio 0,9 %, Glicose 5%, Etanol 13%, Ocitocina, Metoclopramida, Ampicilina, Maleato de Dimetindeno, Ranitidina e Tartarato de Metoprolol¹⁰.

Devido à recomendação do Comitê Organizador Inter-Agências para Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM, sigla do inglês *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) sobre a inconsistência de dados em relação a resposta do MAT para pirogênios não-endotoxinas e a necessidade de validação caso a caso, para cada classe de produtos, tais como biológicos e artigos de saúde, a monografia do MAT preconiza seu uso apenas como um terceiro teste para detecção de pirogênio¹⁰. Portanto, atualmente as Farmacopeias Americana e Brasileira preconizam o Teste de Pirogênios e o LAL, e, a Farmacopeia Europeia recomenda além destes o MAT. Uma complexa revisão sobre o MAT e sua capacidade em detectar pirogênios não-endotoxinas foi recentemente apresentada¹². Apesar dos avanços, fica evidente a necessidade de se demonstrar a aplicabilidade do MAT para qualquer produto que não foi objeto do estudo de validação. Cabe ressaltar que a legislação brasileira sobre Métodos alternativos, a Lei 9.605/1998 contra crimes ambientais e a Lei 11.794/2008 que regulamenta o uso de animais na experimentação e no ensino no Brasil, partilha entre si o reconhecimento de que quando existe método alternativo não é permitido usar animais^{13,14}. Portanto, o Teste de Pirogênios se contrapõe a tendência mundial da substituição do uso de animais por métodos alternativos.

Apesar de todos os esforços pela busca de alternativas ao uso de animais na experimentação e devido à falta de informação sobre a plena aplicabilidade da MAT, o Teste de Pirogênios ainda é amplamente utilizado e preconizado para a maioria dos produtos biológicos². Portanto, frente ao grande número de monografias que requerem testes de pirogenicidade e o número restrito de produtos validados para o MAT houve a necessidade de se ter um diagnóstico dos principais produtos de interesse nacional, principalmente os produtos preconizados exclusivamente pelo Teste de Pirogênios. Com o intuito de incentivar o reconhecimento do MAT como método substitutivo, o objetivo deste estudo foi identificar nas monografias das

farmacopeias Brasileira, Americana e Europeia os produtos injetáveis que requerem o Teste de Pirogênios e/ou o LAL e assim propor os produtos que têm por base somente o teste em coelhos como um ponto de partida para estudos que irão avaliar a aplicabilidade do MAT.

METODOLOGIA

Foi realizado levantamento de todas as monografias de produtos injetáveis da Farmacopeia Europeia (FE) de 2010 (7^o edição)¹¹, Farmacopeia Americana (FA) de 2009 (32/NF27)¹⁵ e Farmacopeia Brasileira (FB) de 2010 (5^o edição)¹⁶ que requerem os Testes de Pirogênios e LAL. Foi construída uma planilha no MS-Excel® com todos os produtos e substâncias classificados pelo tipo de teste preconizado (Teste de Pirogênios e/ou LAL) para cada farmacopeia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do MAT como método substitutivo possui a vantagem de associar a detecção do amplo espectro de pirogênios do teste *in vivo* com a sensibilidade do LAL, podendo também ser utilizado para amostras ambientais como ar e poeira¹⁷. Além disso, é baseado no mesmo princípio do Teste de Pirogênios, ou seja, no mecanismo da febre, só que usando substrato de origem humana, facilitando possíveis correlações *in vivo* e *in vitro*⁸.

A avaliação das monografias dos produtos injetáveis que atualmente usam obrigatoriamente o LAL e principalmente o Teste de Pirogênios, torna-se importante para estimular e nortear estudos sobre a aplicabilidade do MAT para produtos não contemplados no processo de validação, contribuindo para suprir a lacuna de dados na literatura, apontada pelo ICCVAM como um dos problemas para a não aceitação imediata do MAT como substituto do teste em coelhos.

Os resultados indicaram que somente quatro produtos são preconizados nas 3 farmacopeias simultaneamente quanto à exigência de se testar a contaminação pirogênica (Tabela 1). Cabe ressaltar que destes, apenas a Ampicilina Sódica foi um dos produtos validados no MAT.

Tabela 1. Monografias que possuem testes para a detecção de pirogênios nas três farmacopeias.

Produto	FB		FA		FE	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Água - Injetáveis	-----	LAL	-----	LAL	-----	LAL
Ampicilina Sódica	P	LAL	-----	LAL	-----	LAL/MAT
Cefoxitina Sódica	-----	LAL	-----	LAL	-----	LAL
Heparina Sódica	-----	LAL	-----	LAL	-----	LAL

Farmacopeia Brasileira (FB) 2010 (5^o ed), Farmacopeia Americana (FA) 2009 (32/NF27) e Farmacopeia Europeia (FE) 2010 (7^o ed.). P (Teste de Pirogênios), LAL (Lisado de Amebócitos do *Limulus*) e MAT (Teste de Ativação de Monócitos)

Quando o total de monografias dos produtos injetáveis foi contabilizado por farmacopeia, observou-se que os testes de Pirogênios e LAL são preconizados para 639 produtos na FA, 194 na FE e 69 na FB. Quando as monografias são separadas por testes pode ser observado que o LAL é mais utilizado do que o Teste de Pirogênios, sendo o primeiro preconizado em 619 monografias da FA, 157 da FE e 41 na FB. Apesar de menos utilizado do que o LAL, o Teste de Pirogênios é preconizado em todas as farmacopeias, sendo 20 monografias na FA, 37 na FE e 28 na FB (Figura 1). A grande diferença no quantitativo de monografias entre Estados Unidos e demais países se deve - em grande parte - aos medicamentos que, no caso do Brasil e Europa, passam unicamente por teste de esterilidade. Cabe ressaltar que cada país tem sua legislação e necessidades específicas, portanto, nem todos os produtos figuram nas 3 farmacopeias o que leva, também, há uma diferença no número de testes preconizados.

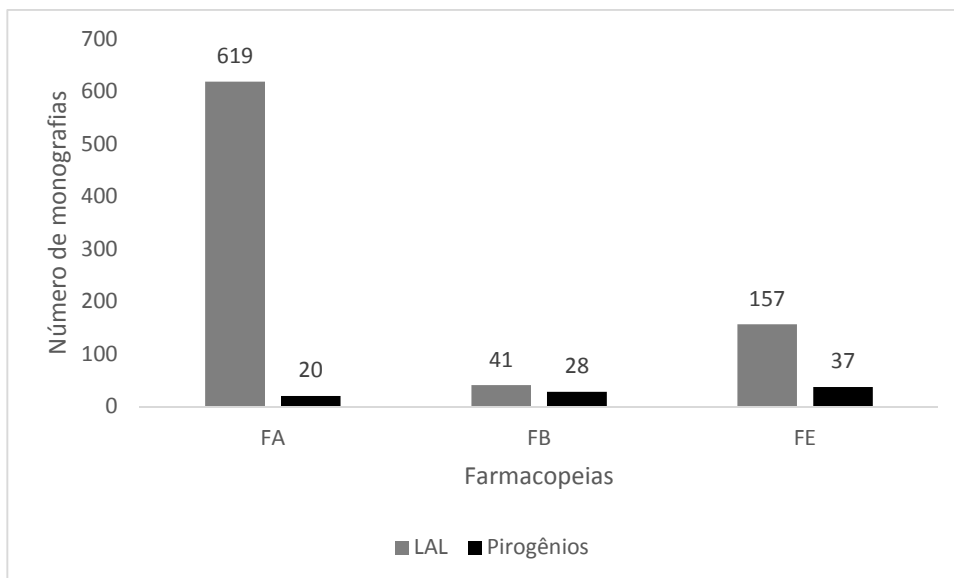


Figura 1 – Número de monografias de produtos injetáveis na Farmacopeia Brasileira (FB) 2010 (5^o ed), Farmacopeia Americana (FA) 2009 (32/NF27) e Farmacopeia Europeia (FE) 2010 (7^o ed.) que requerem o Teste de Pirogênios e LAL.

Buscando identificar as principais classes de produtos que passam exclusivamente pelo Teste de Pirogênios e que sejam de interesse nacional, os resultados também foram avaliados em relação às classes de produtos preconizados nas monografias para cada teste descrito na FB. Foi observado que dos 69 produtos injetáveis que passam por testes de pirogenicidade, 41 fazem exclusivamente o LAL e 28 o Teste de Pirogênios. No primeiro caso, dos 41 produtos injetáveis 39 são medicamentos e apenas dois são produtos biológicos (vacinas febre amarela e anti-poliomielite 1, 2, 3 inativada). Isso demonstra que o LAL, no caso da FB, é preconizado apenas para 5% dos produtos biológicos. No caso das 28 monografias preconizadas para o Teste de Pirogênios, 9 são medicamentos, sendo que destes somente 3 fazem exclusivamente o Teste de Pirogênios representando 33% destes produtos (Arteméter, Cloridrato de Metoclopramida e Flunitrazepam). Os 21 restantes são produtos biológicos (hemoderivados, vacinas e soros hiperimunes) sendo que destes, 19 passam exclusivamente pelo Teste de Pirogênios, representando 90,4% destes produtos (Tabela 2). Destes 19 produtos biológicos, os soros hiperimunes, representam 68%, um valor extremamente significativo.

Tabela 2 – Monografias da Farmacopeia Brasileira: produtos injetáveis que requerem o Teste de Pirogênios e LAL.

Produtos	Classificação	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Ampicilina	Medicamento		
Ampicilina Sódica	Medicamento		
Ampicilina Sódica (Pó)	Medicamento		
Ampicilina Tri-Hidratada	Medicamento		
Arteméter	Medicamento		
Cloridrato de Metoclopramida	Medicamento		
Flunitrazepam	Medicamento		
Glicose	Medicamento		
Sulfato de Morfina	Medicamento		
Fator VII humano	Biológico		
Fator VIII humano	Biológico		
Fator IX humano	Biológico		
Fibrinogênio humano	Biológico		
Plasma humano	Biológico		
Soro Anti-botrópico crotálico laquético	Biológico		
Soro Anti-botrópico crotálico	Biológico		
Soro Anti-botrópico laquético	Biológico		
Soro Anti-botrópico	Biológico		
Soro Anti-botulínico	Biológico		
Soro Anti-crotálico	Biológico		
Soro Anti-difitérico	Biológico		
Soro Anti-elapidico	Biológico		
Soro Anti-escorpiônico	Biológico		
Soro Anti-Ionômico	Biológico		
Soro Anti-loxoscélico	Biológico		
Soro Anti-rábico	Biológico		
Soro Anti- tetânico	Biológico		
Vacina Anti-rábica inativada	Biológico		
Vacina Anti-poliomielite 1,2 3 inativada	Biológico		
Vacina Febre amarela	Biológico		

Cabe ressaltar, que os soros hiperimunes são produtos largamente utilizados no tratamento de acidentes com animais peçonhentos, assim como no tratamento de infecções bacterianas e virais, sendo considerados de grande interesse pelo Ministério da Saúde (MS). Um dos pontos a ser destacado, é que o Brasil possui, o Programa Nacional de Imunizações (PNI) para o qual o INCQS faz análises lote-a-lote de soros e vacinas, antes da distribuição dos mesmos para as Secretárias Estaduais e Municipais. Estas análises correspondem a cerca de 90% dos produtos analisados no Teste de Pirogênios pelo INCQS. Portanto, uma vez reconhecida a aplicabilidade do MAT para soros e vacinas, o número de coelhos pode ser drasticamente reduzido com a substituição do uso desses animais, ratificando os conceitos éticos e reduzindo o custo das análises.

Portanto, este estudo também indica a necessidade da avaliação em paralelo *in vivo* e *in vitro* para cada produto específico de forma a contemplar a recomendação do ICCVAM em relação ao MAT na detecção de pirogênios em diferentes produtos destinados à saúde. Cabe ressaltar, que os produtos biológicos, além do interesse nacional, também podem ser exportados e, desta forma, é importante ratificar o papel do Centro Brasileiro de Métodos Alternativos (BraCVAM) em estimular a condução destes estudos, pois, em termos internacionais, refletirá a credibilidade do país no processo de produção e exportação destes produtos biológicos analisados dentro de padrões éticos e de qualidade.

Apesar das vantagens e o reconhecimento do MAT como um potencial substituto do Teste de Pirogênios, alguns estudos publicados recentemente apontaram possíveis restrições da sua aplicação quando se necessita de uma grande quantidade de sangue por ensaio, assim como o procedimento de coleta do sangue que pode ser considerado invasivo e causar desconforto aos doadores^{21, 22, 23}. A limitação do uso de grandes quantidades de sangue fresco foi contornada com o processo de criopreservação do sangue total desenvolvido por Schindler et al. (2004), sendo seu uso validado posteriormente em 2006. A utilização do sangue criopreservado de pelo menos 4 doadores é uma alternativa viável, tanto economicamente como experimentalmente, quando comparada ao sangue fresco principalmente quando o uso do sangue é necessário em maiores quantidades^{24,25}.

Recentemente, alguns estudos apresentaram a utilização de outras fontes de células mononucleares^{21, 22, 23} para contornar a necessidade de se obter maiores quantidades de sangue quando necessário. O primeiro foi um estudo conduzido por Wunderlich et al (2014), o qual sugere a utilização do sangue bovino no lugar do sangue humano para o MAT. Segundo os autores, o uso do sangue bovino evitaria possíveis contaminações e a influência de fatores relacionados a genética e estilo de vida dos doadores humanos, já que os animais poderiam ser livres de patógenos e mantidos em ambientes apropriados. Entretanto, os resultados encontrados demonstraram que o sangue bovino foi menos reativo e menos sensível do que o sangue humano principalmente para pirogênios não endotoxinas (ácido lipoteicoico e peptidoglicano)²¹. Cabe ressaltar, que o uso do sangue do bovino por mais próximo que seja ao do homem, pode retornar ao problema de extrapolação de dados entre

espécies, que é um dos alvos de críticas do Teste de Pirogênios que é realizado em coelhos.

A outra opção foi proposta por Koryakina et al (2014) sobre o desenvolvimento de um processo de criopreservação de células mononucleares do sangue periférico originadas de filtros leucocitários que podem aumentar a disponibilidade deste tipo celular para ensaios em escala industrial, além de evitar o desconforto da coleta do sangue (flebotomia). Ainda, segundo os autores à utilização destes filtros, normalmente tratados como bio-resíduos em hospitais e centros de doação de sangue, é uma forma de se evitar a manipulação de sangue humano fresco nos laboratórios de nível de biossegurança 2²³.

Também é importante destacar que vários trabalhos têm demonstrado a aplicabilidade do MAT para produtos biológicos, o que representa uma grande vantagem sobre o LAL mesmo no caso onde este pode ser aplicado, como no caso da avaliação de segurança de vacinas. Para a produção da vacina de diferentes cepas de *Neisseria meningitidis* do grupo B, foi utilizada a liberação de IL-6 e TNF- α do sangue total humano e de células mononucleares do sangue periférico durante todo o processo, demonstrando que o MAT foi altamente sensível na detecção de pirogênios¹⁹. Outro estudo realizado por Perdomo-Morales et al²⁰ (2011) concluiu que seus resultados associados a estudos anteriores suportam a substituição do Teste de Pirogênio pelo MAT para Albumina Sérica Humana e para outros hemoderivados que contenham proteínas de uso terapêutico. Além disso, os autores indicam que, no caso da Albumina sérica humana, apesar do LAL ser o método preconizado este apresentou problemas no percentual de recuperação da endotoxina nas condições experimentais avaliadas²⁰.

É importante destacar que alguns estudos também apresentam bons resultados com relação à aplicabilidade do MAT na avaliação da contaminação de células utilizadas na terapia celular, como as células tronco, assim como na biocompatibilidade de próteses, além de demonstrar alta sensibilidade para soluções de diálise¹⁸.

Portanto, com base nos resultados do levantamento das monografias dos produtos que passam pelo Teste de Pirogênios e na importância do controle da qualidade destes no Brasil, fica evidente a necessidade de se estabelecer os produtos biológicos como ponto de partida para estudos de aplicabilidade do MAT e

consequentemente o seu reconhecimento como método alternativo ao uso de animais na detecção de pirogênios. Estes resultados não significam que outros produtos não devam ser analisados, apenas, sugerem uma priorização daqueles em que a substituição do uso de animais poderá se dar de forma imediata.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que os produtos biológicos são a principal classe de medicamentos injetáveis que requerem testes de pirogenicidade, principalmente o Teste de Pirogênios. Este dado reflete na avaliação do controle da qualidade destes produtos que representam mais de 90% dos Testes de Pirogênios realizados no INCQS. Portanto, devido à importância desta classe de produtos no contexto epidemiológico sanitário brasileiro, principalmente em relação aos soros hiperimunes, estes devem ser os primeiros a ser testados para demonstrar aplicabilidade do MAT.

Agradecimentos:

Ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz ressaltando que este trabalho foi parte da tese de doutorado de Cristiane Caldeira e ao Programa de Apoio a Pesquisa Estratégica em Saúde (PAPES/Fiocruz) e a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA, MCTI/CNPq 4025522011-3) pelo apoio financeiro recebido. Isabella Delgado é bolsista de produtividade do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Poole S and Das REG. Towards a 'human pyrogen test'. *Eur. J. Parenteral Sciences* 2001; 6(2):63-64.

- ² Melandri V, Faria G, Caldeira C, Presgrave O. Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de produtos injetáveis sujeitos à Vigilância Sanitária. *Universitas: Ciências da Saúde* 2010; 8 (2): 69-95.
- ³ Spreitzer I, Fischer M, Hartzsch K, Liideritz-Piichel U, Montag T. Comparative study of rabbit pyrogen test and human whole blood assay on human serum albumin. *ALTEX* 2002; 19 (1): 73-75.
- ⁴ Hochstein HD, Munson TE, Outschoorn AS. Comparison of rabbit responses of two *E. coli* endotoxin preparations in the FA rabbit pyrogen test. *Pharmacopeial Fórum*, 1990; 4: 346-351
- ⁵ Pearson FC. Pyrogens: endotoxins, LAL testing, and de pyrogenation. New York: Marcel Dekker Inc; 1985
- ⁶ Hartung T; Aaberge I; Berthold S; Carlin G; Charton E; Coecke S et al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. *ATLA* 2001; 29: 99-123.
- ⁷ Schindler S, von Aulock S, Daneshian M, Hartung, T. Development, Validation and Applications of the Monocyte Activation Test for Pyrogens Based on Human Whole Blood. *ALTEX* 2009; 26(4):265-277.
- ⁸ Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, Fennrich S, Poole S, Mistry Y et al.. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *J. Immunol. Methods* 2005; 298(1-2):161-73.
- ⁹ Schindler S, Spreitzer I, Löschner B, Hoffmann S, Hennes K, Halder M, et al. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. *J. Immunol. Methods* 2006; 316:42-51.
- ¹⁰ ICCVAM Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods1. Validation status of five in vitro test methods proposed for assessing potencial pyrogenicity of pharmaceuticals and other products. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. USA; 2008.
- ¹¹ European Pharmacopeia. Monocyte Activation Test. 7th Edition, Suppl (6.7); 2010. 192p.

¹² Hasiwa N, Daneshian M, Bruegger P, Fennrich S, Hochadel A, Hoffmann S et al. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEX* 2013; 30:169-208.

¹³ Lei nº 9605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. *Diário Oficial União*, 1998; 13 fev.

¹⁴ Lei nº 11794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. *Diário Oficial União*, 2008; 09 out.

¹⁵ United States Pharmacopeia. Pyrogen test, 32/NF 27. Rockville, 2009.124p

¹⁶Farmacopéia Brasileira. Pirogênios, 5ª ed. Brasília, 2010. 229 p

¹⁷Kindinger I, Daneshian M, Baur H, Gabrio T, Hofmann A, Fennrich S et al. A new method to measure air-borne pyrogens based on human whole blood cytokine response. *Journal of Immunological Methods* 2005; 298 (1-2): 143-153.

¹⁸Daneshian M, von Aulock S, and Hartung T. Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay. *Nat Protoc* 2009; 4: 1709-1721. ¹⁶

¹⁹Stoddard MB, Pinto V, Keiser PB, Zollinger W et al. Evaluation of a whole-blood cytokine release assay for use in measuring endotoxin activity of group B *Neisseria meningitidis* vaccines made from lipid A acylation mutants. *Clinical Vaccine Immunology* 2010; 17 (1): 98-107. ¹⁶

²⁰Perdomo-Morales R, Pardo-Ruiz, Z, Spreitzer I, Lagarto A., Montag T. Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin. *ALTEX* 2011; 28: 227-235. 17

²¹Wunderlich, C.; Schumacher, S.; Kietzmann, M. Pyrogen detection methods: Comparison of bovine whole blood assay (bWBA) and monocyte activation test (MAT). *BMC Pharmacology and Toxicology* 2014; 15: 50-57.

²²Wunderlich, C.; Schumacher, S.; Kietzmann, M. Prostagalndin E2 as a read out for endotoxin detection in a bovine whole blood assay. *ournal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2015; 38 (2): 196-198.

²³Koryakina, A.; Frey, E.; Bruegger, P. Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test. *Journal of Immunological Methods* 2014; 405:181-191.

²⁴Schindler S.; et al. Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity test. *Journal Immunological Methods*, 2004; 294:.89-100.

²⁵Schindler, S.; Spreitzer, I.; LoeschneR, B. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. *Journal Immunological Methods*, 2006; 316: 42-51.

ANEXO B MANUSCRITO SUBMETIDO – TOXICOLOGY *IN VITRO***APPLICABILITY OF THE MONOCYTE ACTIVATION TEST (MAT) IN THE ROUTINE OF HYPERIMMUNE SERA OF THE QUALITY CONTROL LABORATORY: COMPARISON WITH THE RABBIT PYROGEN TEST (RPT)**

Cristiane Caldeira da Silva^{1,2}; Octavio Augusto França Presgrave^{1,2}; Thomas Hartung³; Aurea Maria Lage de Moraes⁴; Isabella Fernandes Delgado⁵

¹ Department of Pharmacology and Toxicology, National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

² Centre for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM), National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

³ Johns Hopkins University, Bloomberg School of Public Health, Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT), Baltimore, USA, and University of Konstanz, CAAT-Europe, Germany

⁴ Laboratory of Taxonomy, Biochemistry and Bioprospection of Fungi, Oswaldo Cruz Institute (IOC) Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Vice Director of Education, Research and Strategic Projects, National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence to:

Cristiane Caldeira da Silva.

Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Departamento de Farmacologia e Toxicologia. Avenida Brasil, 4365 – Manguinhos 21045-900 - Rio de Janeiro - RJ – Brazil. Tel.: +55 21 3865-5277. Fax: +55 21 2290-0915. E-mail: cristiane.caldeira@incqs.fiocruz.br

Abstract

Pyrogen tests are safety assays performed in the routine of quality control of injectable products by regulatory agencies. Currently, there are three available testing possibilities: the

Rabbit Pyrogen Test (RPT), the Bacterial Endotoxin Test (BET) and test systems using human whole blood or human monocytes, called Monocyte Activation Tests (MAT). Although BET is often considered as a replacement of the animal test, it is not able to detect pyrogens other than endotoxin. The MAT is based on the human fever reaction and thus most closely reflects the human response. The aim of this study was to carry out a parallel comparison of RPT and MAT for hyperimmune sera batches analyzed in the routine of the quality control laboratory. MAT was performed in the same forty three batches of hyperimmune sera previously tested in RPT. Results showed that MAT has presented a 100% sensitivity and about 85% specificity compared to RPT, i.e. no false-negative results were obtained. Only few suspicious samples which were negative in the RPT after retesting were giving divergent positive results suggesting a lower limit of detection of the MAT. MAT is thus able to detect contaminants in biological products such as hyperimmune sera batches.

Keywords: Rabbit Pyrogen Test, Hyperimmune sera, endotoxin, Monocyte Activation Test

1 – Introduction

Pyrogens are chemically heterogeneous group of fever inducing compounds derived from microorganisms especially bacteria, viruses and fungi. This kind of contamination is considered a great public health problem and can cause symptoms ranging from vascular alterations to shock and death (Hoffmann et al., 2005). Pyrogenic tests are safety assays performed in the routine of quality control of injectable products by regulatory agencies as well as during the manufacturing process (Daneshian et al., 2009). Currently, there are three available testing possibilities: the Rabbit Pyrogen Test (RPT), the Bacterial Endotoxin Test (BET), also known as *Limulus* Amebocyte Lysate test (LAL) and the Monocyte Activation Test (MAT) (Hartung et al, 2001; Melandri et al, 2010; Perdomo-Morales et al., 2011, Hasiwa et al. 2013).

Some countries in the world introduced laws that regulate the use of animals used in experimentation and education and these laws are firmly based on the principle of the Three Rs, to replace, reduce and refine the use of animals. Examples of these laws are the European Directive 2010/63/EU (replacing Directive 86/609/EEC) and the Brazilian Law 11,794/2008. The scope of this legislation is wider and includes the development, validation and

implementation of alternative methods (Hartung 2010, European Commission, 2010) and this idea can be applied to pyrogen tests.

RPT, considered as the gold standard, covers a broader range of substances and it is able to detect endotoxin and non-endotoxin pyrogens (NEP) but it is less sensitive than *in vitro* tests and it is consuming animals (Hartung et al., 2001; Nakagawa et al., 2002). The LAL test is used widely as a simple and highly sensitive *in vitro* method for the detection of endotoxin, however, this test has some inherent limitations and it has not been able to fully replace the rabbit test. This test fails to recognize NEP, which have been largely neglected and represent an important source of pyrogens. Moreover, certain products that are tested in rabbits, such as various biologicals and vaccines, cannot be tested using the LAL (Schindler et al., 2009), since they can induce false-positive results. It was found that all Human Serum Albumin (HSA) batches were contaminated with (1,3)- β -glucans, which interfere with the conventional LAL (Perdomo-Morales et al., 2011).

The studies on the development of a method for replacing RPT was based on isolated peripheral blood mononuclear cells and their cytokine release inducible by pyrogens and they began in the 1980s (Poole et al., 1988). After this, the whole blood (WB) assay was developed, showing its effectiveness in detecting exogenous pyrogens other than endotoxin (Hartung and Wendel, 1995; Hartung and Wendel 1996; Fennrich et al., 1999; Hartung et al., 2001; Schindler et al., 2009, Hasiwa et al., 2013).

Five test systems using human whole blood or human monocytes, called Monocyte Activation Test (MAT), have been internationally validated and can be a potential replacement for the RPT (Hoffmann et al., 2005). This test can be used to detect cytokines release by activated human monocytes or monocytic cells such as interleukin-1beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF α), which have an important role in fever pathogenesis. With the use of cryopreserved whole human blood by the introduction of a standardized freezing procedure using DMSO as a cryoprotective agent, MAT became more standardized and more widely available and demonstrated that it can be used as a tool to study details of the fever reaction pathway in the innate human immune response (Schindler et al., 2004; Schindler et al., 2006).

However, in spite of the fact that it can be used for a wide variety of products and its capability to detect pyrogenicity mediated by NEP, there are insufficient data to support this broader application. The ESAC Statement On The Validity Of In-Vitro Pyrogen Tests of 2006

(ECVAM, 2006) endorsed MAT that were in 2010 included in the European Pharmacopoeia (EDQM, 2010), as a third method to detect endotoxin contamination in human parenteral drugs on a case-by-case basis, subject to validation for each specific product to demonstrate equivalence to RPT (ICCVAM, 2008). For the majority of biological products, the Brazilian Pharmacopoeia still recommends the RPT as a mandatory toxicological assay within quality control (Presgrave, 2003; Melandri et al., 2010).

Some reports about biological products indicated that although they have passed in RPT and LAL they have caused pyrogenic episodes in patients, indicating that these tests do not always provide sufficient safety support (Perdomo-Morales et al., 2011; Hasiwa et al., 2013). Therefore, the development of MAT using human blood, provided a convenient and validated *in vitro* alternative for biological products. The US Interagency Coordinating Committee for the Validation of Alternative Test Methods (ICCVAM) declared that “the MAT is suitable after a product-specific validation as a replacement for the rabbit pyrogen test” (ICCVAM, 2008), therefore, is necessary to compare the MAT and RPT for biological products.

Hyperimmune sera (HS) are an important class of biological products subject to health surveillance. Many of them, like anti-venom sera, are used on a large scale for the treatment for poisoning by snakebite, scorpions, spiders and centipedes. Other kinds of HS include those used in the treatment of patients with diseases caused by microorganisms (bacteria or viruses), such as anti-tetanus and anti-rabies sera. All HS produced in Brazil were analyzed in the National Institute of Quality Control in Health (INCQS) before being distributed to Vaccination Centers as part of the National Immunization Program. These HS analyzed are mainly: anti-botherpic (ABS), anti-rabies (ARS), anti-crotalic (ACS) and anti-tetanic (ATS) and those represented more than 90% of the products performed by the RPT. The aim of this study was to carry out a parallel comparison of RPT and MAT for HS batches analyzed in the routine of the quality control laboratory.

Samples

Forty three batches of HS were selected from samples tested in the routine of the quality control. All 18 samples that needed to be repeated were used for this study and 25 non pyrogenic samples for RPT were randomly selected. The HS analyzed from two important manufacturers (A and B) included: Anti-Bothropic Serum (ABS), Anti-Bothropic-Lachetic Serum (ABLS), Anti-Crotalic Serum (ACS), Anti-Tetanic Serum (ATS), Anti-Elapidic Serum (AELS), AES (Anti-Escorpionic Serum) and Anti-Rabies Serum (ARS). MAT was performed on the same batches of the HS previously tested in the RPT.

Rabbit Pyrogen Test

No animal was used solely for the purpose of this study, since they were used in the routine assay for detection of pyrogenic contamination of injectable products. For this study, data from samples represent the results of 165 rabbits provided by Laboratory Animals Breeding Center (Cecal) from Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) and used for analyses by the INCQS. The RPT was performed in healthy male New Zealand white rabbits weighing not less than 1.5 kg. All animal experimentations were carried out in accordance with approved Institutional protocols by Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from Fiocruz and the recommendations outlined in the Brazilian Pharmacopoeia that follows the same directions of the United States Pharmacopoeia. Animals were kept in individual cages, in ventilated racks, room temperature $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 50-70% humidity and received autoclaved hay as environmental enrichment. HS samples were injected (1 mL/kg of body weight) into a marginal ear vein of each of three rabbits. After the injection, the rectal temperatures of the animals were recorded with a PyroMon® system (Ellab, Hillrod, Denmark) over a 3 hours period. When none of the rabbits showed a temperature increase of $\geq 0.5^{\circ}\text{C}$ over its basal temperature, the sample tested was classified as Non-Pyrogenic (NP). When only one rabbit showed a temperature increase of $\geq 0.5^{\circ}\text{C}$, the test was Repeated (R) using five different rabbits. If no more than three of the eight rabbits tested showed an individual temperature increase of $\geq 0.5^{\circ}\text{C}$ and if the sum of the temperature increases for the eight rabbits did not exceed 3.3°C , the sample tested was classified as NP. Otherwise, if these criteria have not been satisfied the sample was classified as Pyrogenic (P)

Monocyte Activation Test

Immune Stimuli

The standard endotoxin stock solution was prepared from Lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) diluted in pyrogenic-free 0.9% sodium chloride solution (Halex Istar, Goiânia, Brazil). We used Endotoxin Equivalents Units (EEU) as values for the contaminant concentration as read off the standard endotoxin dose-response curve range from 0.125 to 5 EU/mL (Method A) or estimated by comparison with responses to standard endotoxin solution (Method B). For the both methods Endotoxin limit of 5 EU/ml was used as pass/fail criterion for MAT which is the LPS limit concentration taken as the lowest dose that produce fever in rabbits and humans (Hochstein et al., 1990).

Determination of the MVD

The Maximum Valid Dilution (MVD) was calculated for ABS multiplying the Endotoxin Limit Concentration (ELC) by the concentration of test solution (C) and divided by the limit of detection (LOD). The ELC was calculated as K/M , where K is the threshold pyrogenic dose of endotoxin per kilogram of body mass per day (5EU/kg/24 h) and M is the daily maximum recommended bolus dose of product per kg body mass. Maximum dose of ABS is 120 ml/70kg/24 h. The ELC for ABS was found to be 2.9 EU/mL.

Determination of the LOD

The limit of detection (LOD) was determined using the endotoxin standard curve (0.125 to 5 EU/mL) determining the concentration of endotoxin corresponding to the cut-off value. The cut-off value was expressed as optic density (OD) and it was calculated using the mean of the 4 replicates for the responses to the blank plus three times the standard deviation (SD) of the 4 replicates of the responses to the blank.

Test for interferences

Three batches of pyrogenic-free ABS (manufacturer A, Brazil) were used. The test was conducted by incubating diluted whole blood with geometric sample dilutions spiked with 0.5 EU/ml and assayed in parallel with the corresponding unspiked dilution. Dilutions with endotoxin recovery within the 50-200% range were considered interference-free and the first was defined as minimum valid dilution (MinVD). The data are expressed by mean \pm SD of 4 replicates.

Blood samples

Heparinized blood samples were collected from 4 healthy donors. Differential blood cell counts were routinely performed with a Cell Counter (Hemogram 60 BioClin) to exclude donors with acute infection. Under sterile conditions endotoxin-free Sorönsen's phosphate buffer (Acila GMNmbh, Mörfelden-Walldorf, Germany) was mixed with 20% v/v endotoxin-free Dimetil sulfoxide (DMSO, Wak Chemie Medical GmbH, Steinbach, Germany) and this solution was mixed with fresh blood (1:2) as described by Schindler et al. (2006). The blood from the four volunteers was aliquoted in pre-cooled cryotubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) and directly frozen at -80°C . Thawed bloods were pooled at the time of testing. The same pooled cryo-preserved blood was used for all experiments.

Whole blood incubation

Human whole blood incubations were performed as described previously in European Pharmacopoeia (2010). Thawed heparinized cryo-preserved whole blood was diluted with 900 μL saline and stimulated with 100 μL of LPS in polypropylene vials (Eppendorf, Hamburg, Germany). After incubation for 16 h at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 , the vials were closed and stored at -20°C until cytokine measurement.

Cytokine measurement

Commercially available Interleukin-1 β and Interleukin-6 kit (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) with a sensitivity range from 3.9 to 250 pg/ml for IL-1 β and 3, 12 - 300 pg/mL for IL-6 were used. The data are mean \pm SEM of 4 replicates.

Statistics

The results obtained in this study were analyzed by performance comparisons between the *in vitro* (MAT) and the *in vivo* (Pyrogen Rabbit Test), derived from the contingency table. The following parameters were calculated: sensitivity (the ratio of *in vivo* pyrogenic classified *in vitro* as pyrogenic); specificity (the ratio of *in vivo* non-pyrogenic classified *in vitro* as non-pyrogenic); accuracy (the ratio of product classes [pyrogenic and non-pyrogenic] correctly classified *in vitro*); false-positives and false-negatives.

3- Results

The interference test for ABS in WB-MAT was conducted in clean samples of three different batches. As the quantification range in MAT was up to 0.125 EU/ml LPS, and the spikes were 0.5 EU/ml. For ABS it was possible to quantify IL-1 and IL-6 recovery to LPS between 50-200% in almost all diluted samples except 1:5 (table 1). Therefore, we chose for this study the MinVD 1:10.

Table 1: Endotoxin recoveries (%) obtained in the interference test with Anti-Bothropic Serum in WB-MAT using IL-1 β and IL-6 as readouts.

Readout	Batches	Dilutions							
		0	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
IL-1 β	A	36	47	199	132	112	105	111	74
	B	5	56	103	149	100	152	161	147
	C	6	115	119	115	134	105	110	146
	D	20	51	181	110	129	176	111	113
IL-6	A	10	60	100	170	137	78	149	178

B	8	78	167	≥200	130	90	159	184
C	1	65	99	≥200	≥200	169	134	176
D	1	59	132	≥200	137	179	149	178

Recovery was calculated using the mean value of endotoxin equivalent concentrations (EEU/ml) of the spiked sample. ABS at 0.5 EU/ml (S) and the un-spiked samples (US) as follows: % Recovery = ((S-US)/0.5) x100.

Table 2 summarizes the relationship between the HS samples (1:10 diluted) results performed in RPT and MAT with IL-1 β readout. Batches 1 to 25 passed the RPT, 26 to 40 passed the RPT after the retest and batches 41 to 43 failed the RPT according to the Brazilian Pharmacopoeia guidelines, showing pyrogenic contamination. When the results of RPT were compared to the MAT, we observed that batches 36 to 43 clearly failed MAT in both methods, i.e these batches showed pyrogenic contamination. However, two batches 34 and 35 failed MAT only in Method B, although in the Method A the endotoxin equivalent concentration was very close to the limit dose. Probably this difference between both methods is due to the adjustment of the dose-response curve in the Method A, which involves a comparison of the batches being examined with a standard of endotoxin dose-response curve. This way, depending on the slope, the endotoxin equivalent concentration can be modified.

Table 2: Comparative results of pyrogen evaluation of HS by MAT and RPT

Manufacturer	Batches	Samples	Individual Temperature Variation	Animals* $\geq 0.5^{\circ}\text{C}$	RPT ($\Sigma \Delta T$)** (°C)	MAT (UEE/ml) ^a	MAT ^b
A	1	ATS	0.20; 0.20; 0.00	0	0.4 ^{NP}	0.31 \pm 0.15 ^{NP}	NP
A	2	ABS	0.30; 0.00; 0.00	0	0.3 ^{NP}	0.16 \pm 0.03 ^{NP}	NP
A	3	ABS	0.00; 0.20; 0.20	0	0.4 ^{NP}	0.16 \pm 0.12 ^{NP}	NP
A	4	ABS	0.00; 0.10; 0.00	0	0.1 ^{NP}	0.18 \pm 0.04 ^{NP}	NP
A	5	ABS	0.30; 0.20; 0.20	0	0.7 ^{NP}	0.43 \pm 0.2 ^{NP}	NP
A	6	ABS	0.00; 0.20; 0.20	0	0.4 ^{NP}	0.82 \pm 0.01 ^{NP}	NP
B	7	ABS	0.00; 0.10; 0.20	0	0.3 ^{NP}	2.85 \pm 0.10 ^{NP}	NP

B	8	ABS	0.10; 0.00; 0.00	0	0.1 ^{NP}	0.16 ± 0.80 ^{NP}	NP
B	9	ABS	0.20; 0.20; 0.00	0	0.4 ^{NP}	0.31 ± 0.05 ^{NP}	NP
B	10	ABS	0.10.0.10.0.20	0	0.4 ^{NP}	0.18 ± 0.02 ^{NP}	NP
B	11	ABS	0.00; 0.00; 0.00	0	0 ^{NP}	0.82 ± 0.01 ^{NP}	NP
A	12	ABS	0.40; 0.20; 0.20	0	0.3 ^{NP}	0.25 ± 0.01 ^{NP}	NP
B	13	ABS	0.10; 0.10; 0.20	0	0.4 ^{NP}	0.02 ± 0.08 ^{NP}	NP
A	14	ABS	0.00 0.00; 0.00	0	0 ^{NP}	0.82 ± 0.01 ^{NP}	NP
B	15	ABS	0.00; 0.00; 0.10	0	0.1 ^{NP}	0.8 ± 0.01 ^{NP}	NP
B	16	ABS	0.00; 0.00; 0.00	0	0 ^{NP}	0.05 ± 0.02 ^{NP}	NP
A	17	ABS	0.00; 0.00; 0.20	0	0.2 ^{NP}	0.85 ± 0.012 ^{NP}	NP
B	18	ABS	0.00; 0.40; 0.00	0	0.4 ^{NP}	0.15 ± 0.03 ^{NP}	NP
B	19	ARS	0.20; 0.00; 0.00	0	0.2 ^{NP}	0.55 ± 0.04 ^{NP}	NP
B	20	ABS	0.00; 0.10; 0.00	0	0.1 ^{NP}	0.49 ± 0.01 ^{NP}	NP
B	21	ACS	0.00; 0.10; 0.10	0	0.2 ^{NP}	0.05 ± 0.02 ^{NP}	NP
B	22	ABLS	0.00; 0.30; 0.10	0	0.4 ^{NP}	0.64 ± 0.01 ^{NP}	NP
B	23	ABS	0.00; 0.20; 0.20	0	0.4 ^{NP}	0.12 ± 0.02 ^{NP}	NP
B	24	ARS	0.00; 0.00; 0.00	0	0.1 ^{NP}	0.15 ± 0.02 ^{NP}	NP
B	25	ARS	0.10; 0.00; 0.00	0	0.1 ^{NP}	0.55 ± 0.43 ^{NP}	NP
B	26	ACS	0.50; 0.10; 0.00; 0.20; 0.00; 0.20; 0.00; 0.10	1	1.1 ^{R/NP}	0.18 ± 0.09 ^{NP}	NP
B	27	ABS	0.60; 0.30; 0.30; 0.10; 0.40; 0.60; 0.20; 0.00	2	2.5 ^{R/NP}	0.59 ± 0.08 ^{NP}	NP
B	28	ABLS	0.60; 0.20; 0.40; 0.50; 0.50; 0.30; 0.20; 0.30	3	3 ^{R/NP}	0.19 ± 0.03 ^{NP}	NP
B	29	ARS	0.50; 0.30; 0.40; 0.10; 0.10; 0.20; 0.20; 0.30	1	2.1 ^{R/NP}	2.34 ± 0.06 ^{NP}	NP
B	30	ABLS	0.20; 0.10; 0.60; 0.10; 0.10; 0.20; 0.30; 0.40	1	2 ^{R/NP}	2.34 ± 0.05 ^{NP}	NP
B	31	ABLS	0.30; 0.20; 0.60; 0.00; 0.10; 0.20; 0.30; 0.30	1	2 ^{R/NP}	3.08 ± 0.05 ^{NP}	NP
A	32	AELS	0.50; 0.20; 0.10; 0.10; 0.10; 0.30; 0.00; 0.10	1	1.5 ^{R/NP}	2.66 ± 0.02 ^{NP}	NP
A	33	ABS	0.00 ; 0.60 ; 0.00; 0.20; 0.40; 0.10; 0.20; 0.20	1	1.7 ^{R/NP}	0.12 ± 0.05 ^{NP}	NP
B	34	ABLS	0.30; 0.50; 0.10; 0.20; 0.50; 0.30; 0.30; 0.50	3	2.7 ^{R/NP}	4.65 ± 0.37 ^{NP}	P

B	35	ABS	0.40; 0.40; 0.50; 0.00; 0.10; 0.00; 0.10; 0.00	1	1.5 ^{R/NP}	4.53 ± 0.20 ^{NP}	P
B	36	ATS	0.80; 0.10; 0.50; 0.30; 0.00; 0.10; 0.20; 0.60	3	2.6 ^{R/NP}	5.47 ± 0.34^P	P
B	37	ABS	0.10; 0.50; 0.10; 0.10; 0.10; 0; 0; 0.40	1	1.3 ^{R/NP}	5.92 ± 0.51^P	P
A	38	ARS	0.30 ;0.10; 0.60; 0.10; 0.15; 0.00; 0.10; 0.00	1	1.35 ^{R/NP}	5.3 ± 0.08^P	P
A	39	AES	0.35; 0.00; 0.50; 0.20; 0.45; 0.05; 0.10; 0.2	1	1.85 ^{R/NP}	5.8 ± 0.32^P	P
A	40	AES	0.35; 0.00; 0.50; 0.20; 0.45; 0.05; 0.10; 0.3	1	1.85 ^{R/NP}	5.4± 0.23^P	P
A	41	ABLS	0.30; 0.40; 0.70; 0.50; 0.50; 0.40; 0.50;0.60	6	3.9^{R/P}	6.22 ± 0.46^P	P
A	42	ABLS	0.30; 0.70; 0.50; 0.30; 0.50; 0.60; 0.40;0.40	4	3.7^{R/P}	6.08 ± 0.44^P	P
A	43	ARS	0.75; 0.30; 1.05; 0.30; 0.40; 0.30; 0.40; 0.65	3	4.15^{R/P}	7.2± 0.95^P	P

NP = non-pyrogenic, R/NP = Repeat/Non Pyrogenic, R/P = Repeat / Pyrogenic. * Pharmacopeia Criteria for the number of animals ≤ 3 (NP), ≥ 4 (P). ** Pharmacopoeia criteria: Sum (Σ) Individual Variation of temperature (VIT) $\leq 3.3^{\circ}\text{C}$ (NP); $> 3,3^{\circ}\text{C}$ (P). ^aMethod A. Values are means of three replicates with standard deviation (SD). ^b Method B. It was considered 5 EU/mL as a positive control endotoxin. ATS (anti-tetanic serum), Anti-Bothropic Serum (ABS), Anti-Bothropic-Lachetic Serum (ABLS), Anti-Crotalic Serum (ACS), Anti-Tetanic Serum (ATS), Anti-Elapidic Serum (AELS), AES (Anti-Escorpionic Serum) and Anti-Rabies Serum (ARS).

In order to understand the differences found between the Methods A and B for HS routine, 5 batches of ABS were artificially spiked with endotoxin in the limit dose (5EU/mL) and analyzed for the Method A and B for IL-1 β and IL-6 as readouts (Table 3). When the results were evaluated with IL-1 β readout, batches A and E passed the MAT using Method A and fail using Method B ratifying the results summarized on Table 1. For IL-6 readout only batch A passed the MAT using method A and fail using Method B. This comparison between the methods should be further investigated in future studies since there are few data in the literature comparing the two methods for the same lots of any injectable products.

Table 3: Comparative results of pyrogen evaluation of HS by MAT in the Method A and B

Batch	IL-1 β		IL-6	
	Method A UEEm ⁻¹	Method B	Method A UEEm ⁻¹	Method B
A	4.136 \pm 0,28 ^{NP}	P	4.904 \pm 0,035 ^{NP}	P
B	5.373 \pm 0,25 ^P	P	5.934 \pm 0,07 ^P	P
C	5.264 \pm 0,16 ^P	P	5.254 \pm 0,127 ^P	P
D	5.423 \pm 0,31 ^P	P	5.654 \pm 0,043 ^P	P
E	4.956 \pm 0,13 ^{NP}	P	5.823 \pm 0,021 ^P	P

Method A. The values are the means of 3 replicates with S.D. Method B. It had been considered as positive control 5UEmL⁻¹ of endotoxin.^{NP} Non pyrogenic.^P Pyrogenic

Predictive abilities

Table 4 and 5 show the concordance and discordance frequency observations between *in vivo* and *in vitro* assays. We observed differences between the two methods (A and B) with regard to the number of false negatives, i.e., products classified as non pyrogenic *in vivo* and pyrogenic *in vitro*. Among the 43 products, only 5 were considered false positives for the Method A and 7 for the Method B. This result can be present due the higher sensitivity for MAT than RPT to detect pyrogen contamination. The differences between method A and B can be due to adjusting the endotoxin standard curve (Method A) determining the concentration of endotoxin corresponding to the OD while Method B is a yes-or-no type, it means, if sample response is below the positive control response, it is considered non pyrogenic and when the sample response is equal or higher than the positive control, it is considered as pyrogenic.

Table 4: Contingency table using the Method A WB MAT values.

<i>In vitro</i> classification	<i>In vivo</i> Classification	
	Pyrogenic	Non-Pyrogenic
Pyrogenic	3 (a)	5 (b)
Non-Pyrogenic	0 (c)	35 (d)

number of samples for which the RPT and MAT are positive (true positive), b= the number of samples for which

the RPT is negative and the MAT is positive (false positive), c = The number of samples which the RPT is positive and MAT is negative (false negative), d = the number of samples which the RPT and MAT are negative (true negative).

Table 5: Contingency table using the Method B WB MAT values

		<i>In vivo</i>		a = the
		Classification		
<i>In vitro</i> classification	Pyrogenic	Pyrogenic	Non-Pyrogenic	
		Pyrogenic	3 (a)	7 (b)
	Non-Pyrogenic	0 (c)	33 (d)	

number of samples for which the RPT and MAT are positive (true positive), b= the number of samples for which the RPT is negative and the MAT is positive (false positive), c = The number of samples which the RPT is positive and MAT is negative (false negative), d = the number of samples which the RPT and MAT are negative (true negative).

We found 100% of sensitivity for both the A and B method (Table 6). Therefore, MAT was able to detect all cases of products considered pyrogenic in the RPT. Due the differences observed between the method A and B about false-positive results we found 87,5% and 82,5% of specificity, respectively. We also analyzed the accuracy, which refers to the degree of agreement between the results from the diagnostic test under study and those from a reference test. The concordance between the MAT and the RPT were 88,3 % and 83,7 % for A and B, respectively.

Table 6: Predictability of the MAT for 43 products based on method A and B

Parameter	MAT Values (%)	
	Method A	Method B
Sensitivity	100	100
Specificity	87,5	82,5
Accuracy	88,3	83,7
False Negatives	0	0
False Positives	11,6	16,3

4- Discussion

Biologicals are an important class of products evaluated in the routine of the quality control laboratory and responsible for the use of a great number of animals in RPT. Directive 2010/63/EU is firmly based on the principle of the Three Rs and enforces the replacement of animal tests when validated alternatives exist (European Commission, 2010). The RPT has to be evaluated with regard to the Three Rs, since for HS, none of the alternatives methods is considered as a full substitute of the rabbits, besides, it is not recommended to re-use animals due to the possibility of cross reaction (Williams, 2007). In this case, Freitas et al. (2011) proposed the reduction of the number of rabbits used in RPT by the re-use up to four times in one week, without interfering in the reaction, while the RPT has to be considered as a mild pain test. Directive 2010/63/EU (article 16), imposes restrictions on re-use, which were considered to limit research because the least pain, suffering, distress or lasting harm and which are most likely to provide satisfactory results shall be selected. Although the RPT can be considered as a mild pain test and the re-use contributes to the reduction of the use of animals in RPT for HS quality control, quite a number of rabbits continue to be used.

When evaluating the used of LAL in the HS quality control, Fingola et al. (2013) proposed to use the kinetic chromogenic LAL (C-LAL) assay for the determination of bacterial endotoxin in samples of ABS. However, the LAL Test is not considered a substitute for RPT since it is not able to detect other kinds of pyrogens. Perdomo-Morales et al. (2011) indicated

that despite the LAL assay is implemented for pyrogen testing of some biological products, they encountered problems with endotoxin recovery in the interference test with C-LAL that invalidate the use of LAL as an end-product endotoxin test for HSA. Failure to recover endotoxin from biological products with LAL has been documented in previous studies (Hochstein et al., 1979; Jürgens et al., 2002; Perdomo-Morales et al., 2011)

The MAT was established as a true alternative for pyrogen testing, detecting LPS, NEP, and mixtures and can be considered a different approach in pyrogen testing. This test mimicks the human fever reaction and reflects the reactions of the human innate immune system better than the other two methods (RPT and LAL) and thus allows a more realistic prediction of the pyrogenic activity. Our results showed that MAT already demonstrated its effectiveness and sensitive in detecting pyrogens for HS batches analyzed in the quality control routine providing a real-life picture of the performance of MAT.

Any decision regarding specific criteria for acceptable levels of sensitivity and specificity in a given situation involves weighing the consequences of leaving samples undetected (false negatives) against “erroneously” classifying satisfactory samples as pyrogenic (false positives). In that case, there were no false-negative results. The positive findings for some negative RPT assays shows MAT is capable to detect some limit endotoxin concentration that rabbit cannot detect due to biological variation.

One of the problems in order to compare *in vivo* and *in vitro* tests was related to biological intrinsic variation of temperature of the animals. When de RPT had positive or negatives results, MAT had the same results. However, when the RPT had suspicious results and it was necessary to repeat the test, MAT can show discordant results probably due to the biological variation of rabbits. Perdomo-Morales et al. (2011) have supported the replacement of RPT with MAT as final release test for pyrogens in HSA, and probably also in other blood-derived products and therapeutic proteins. In our study the results showed that MAT has good sensitivity and specificity and is able to detect contaminants in biological products such as HS batches.

Recently, some authors have suggested that MAT is not widely used due to the need of large amount of blood to be used, even if it is cryopreserved. Koryakina et al. (2014) have developed and qualified a procedure to prepare functional monocytes as cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the leukocyte filters. These filters are used in the separation of blood in blood donation centers and are normally treated as biological waste.

Solati et al. (2015) also used the MAT using frozen pooled human mononuclear cells (MNC) showed that it is a highly sensitive, specific and reproducible pyrogen test, able to detect and quantify endotoxin and non-endotoxin pyrogenic contaminations in parenteral pharmaceuticals.

Another study suggests the use of bovine whole blood (Wunderlich et al., 2014; Wunderlich et al, 2015). The authors proposed detection of endotoxin and non-endotoxin pyrogens using a bovine whole blood assay, but, they also stated that “further efforts are indispensable to improve the method’s functionality, detection limits and robustness as well as to verify whether it can detect further pyrogens including lipopeptides”. It should be taken into account that the use of bovine blood goes against the 3Rs concept. Animal experimentation is criticized not only for ethical reasons, but, also because animal model may not correspond exactly to human response. The use of bovine blood may be a step backwards in terms of the 3Rs concept of animal replacement. If there is a method that uses human cells, like MAT does, it means that it produces the same response and brings not back the problem of extrapolation of data between species.

The results of this study are very important since we demonstrated the applicability of MAT to hyperimmune sera, which were not object of its validation. This fact can allow MAT to replace rabbits since in contrary of what was thought, since the official acceptance of the MAT, the number of animals used for pyrogen testing did not fall but increased by about 10,000 to 170,000 (Hartung, T, 2015). Brazil does not have an official number of animals used yet, but, as an example, the Brazilian National Institute of Quality Control in Health (INCQS) uses about 600 rabbits per year only for the routine pyrogens testing, whereas HS represents about 90% of samples tested (Caldeira, 2015).

5 - Conclusions

This study showed that MAT presented the same results as RPT when RPT was clearly negative or positive. In cases where RPT result was suspicious (need of second test with 5 different rabbits), MAT could present a different result, but, it never occurred a false negative in MAT results. This finding shows that MAT is more sensitive than RPT and may detect pyrogenicity earlier than RPT. Taking into account the safety for users, false positive is better than false negative. Besides, in this case, MAT may not be understood as giving false positive

response, since rabbits already have shown that there was an amount of pyrogenic substance that led to repeat the test, but, that was not sufficient to be detected as fever response, maybe due to biological variation. These results show that MAT may replace rabbits in pyrogen test of hyperimmune sera, filling a lack of information in the literature for this specific product.

Acknowledgments

We thank to the Brazilian Network for Alternative Methods – Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA/MCTI) and the Program to Support Strategic Research on Health - Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica em Saúde (PAPES/FIOCRUZ) for provided financial support.

Conflict of interest statement

Thomas Hartung, a co-investigator on this report, holds patents as inventor of the whole blood pyrogen test and the use of cryopreserved blood, which are licensed to Merck-Millipore; he receives royalties from Merck-Millipore from sales of the kit version.

References

- Brandenburg, K. et al. (2009). The expression of endotoxic activity in the Limulus test as compared to cytokine production in immune cells. *Curr. Med. Chem.* 16, 2653-2660. <http://dx.doi.org/10.2174/092986709788682001>
- Caldeira, C. Avaliação da contaminação pirogênica em soros hiperimunes e ambientes sujeitos a vigilância sanitária: comparação dos métodos in vitro e in vivo aplicados ao controle da qualidade. 2015. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2003.
- Daneshian, M., von Aulock, S., and Hartung, T. (2009). Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay. *Nat Protoc* 4, 1709-1721. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.159>

Dehus, O., Hartung, T., and Hermann, C. (2006). Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with *Limulus* amoebocyte lysate assay. *J. Endotoxin Res.* 12, 171-180. <http://dx.doi.org/10.1179/096805106X102156>

European Commission (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the council of 22 September 2010 and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF>

ECVAM (2006). Statement on the validity of in-vitro pyrogen tests. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC24_statement_pyrogenicity_1.pdf (last accessed 27 March 2015)

EDQM (2010). European Pharmacopoeia. Ph. Eur. 7th Edition, Chapter 2.6.30. <http://www.edqm.eu/en/edqm-homepage-628.html>

Freitas, J. et al. (2011). The re-use of rabbits in pyrogen testing (RPT) of hyperimmune sera and vaccines contributes to the reduction of animal use. *ALTEX*, Linz, 28: 23.

Hartung T, Wendel A (1996). Detection of pyrogens using human whole blood. *In Vitro Toxicol.*; 9(4):353-359. <http://dx.doi.org/10.1021/tx970209z>

Hartung T, et al. (2001). Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. The report and recommendations of ECVAM Workshop 43. European Centre for the Validation of Alternative Methods. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *ATLA*; 29(2): 99-123.

Hartung, T. (2010). Comparative analysis of the revised Directive 2010/63/EU for the protection of laboratory animals with its predecessor 86/609/EEC – a t4 report. *ALTEX*, 27:285-303.

Hartung T. (2015). The human whole blood pyrogen test - lessons learned in twenty years. *ALTEX*. 32(2): 79-100. <http://dx.doi.org/10.14573/altex.1503241>.

Hasiwa, N. et al. (2013). Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEX*. 30(2): 169-208. <http://dx.doi.org/10.14573/altex.2013.2.169>

Hochstein, H. D et al. (1979). Limulus ameobocyte lysate testing of normal serum albumin (human) in the United States since 1975. *Dev. Biol. Stand.* 44: 35-42.

Hochstein, H. D; Munson, T. E; Outschoorn, A. S. Comparison of rabbit responses of two *E. coli* endotoxin preparations in the FA rabbit pyrogen test. *Pharmacopeial Forum*, p. 346-351, 1990.

Hoffmann, S. et al. (2005). International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *J. Immunol. Methods*; 298(1-2):161-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2005.01.010>

ICCVAM (2008). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Validation Status of Five In Vitro Test Methods Proposed for Assessing Potential Pyrogenicity of Pharmaceuticals and Other Products.

Jürgens, G. et al. (2002). Investigation into the interaction of recombinant human serum albumin with Re-lipopolysaccharide and lipid A. *J. Endotoxin Res.* 8: 115-126. <http://dx.doi.org/10.1179/096805102125000263>

Koryakina, A.; Frey, E.; Bruegger, P. (2014). Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test. *J Immunol Methods*; 405: 181-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2014.01.005>

Melandri, V. et al. (2010). Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de produtos injetáveis sujeitos à Vigilância Sanitária. *Universitas: Ciências da Saúde*, 8 (2), 69-95. <http://dx.doi.org/10.5102/ucs.v8i2.1150>

Nakagawa Y, Maeda H, Murai T (2002). Evaluation of the in vitro test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with human blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*; 9(3), 588-597. <http://dx.doi.org/10.1128/CDLI.9.3.588-597.2002>

Perdomo-Morales, R., Pardo-Ruiz, Z., Spreitzer, I., et al.(2011). Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin. *ALTEX* 28, 227-235. <http://dx.doi.org/10.14573/altex.2011.3.227>

Pool, E. J. et al. (1998). The detection of pyrogens in blood products using an ex vivo whole blood culture assay. *J. Immunoassay*; 19(23), 95-111. <http://dx.doi.org/10.1080/01971529808005475>

Presgrave, O. A. F. Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis. 2003. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2003.

Punsmann, S.; et al. (2013). Ex Vivo Cytokine Release and Pattern Recognition Receptor Expression of Subjects Exposed to Dampness: Pilot Study to Assess the Outcome of Mould Exposure to the Innate Immune System. *PLoS One*, 8 (12), 1-10. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082734>

Schindler, S. et al. (2004). Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing. *J. Immunol. Meth.* 294, 89-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.019>

Schindler S., et al. (2006). International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. *J. Immunol. Methods*; 316, 42-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2006.07.023>

Schindler, S. et al. (2009). Development, Validation and Applications of the Monocyte Activation Test for Pyrogens Based on Human Whole Blood. *ALTEX*; 26 (4), 265 - 277. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.159>

Solati, S. et al. (2015). An improved monocyte activation test using cryopreserved pooled human mononuclear cells. *Innate Immun.* Apr 23 [Epub ahead of print]. <http://dx.doi.org/10.1177/1753425915583365>

Williams, L. K. Endotoxins. Pirogens: LAL Testing and Depyrogenation. 2. Ed. New York: Marcel Dekker, 2007.

Wunderlich, C.; Schumacher, S.; Kietzmann, M. Pyrogen detection methods: Comparison of bovine whole blood assay (bWBA) and monocyte activation test (MAT). *BMC Pharmacology and Toxicology*, 15 p.50-57, 2014. <http://dx.doi.org/10.1186/2050-6511-15-50>

Wunderlich, C.; Schumacher, S.; Kietzmann, M. Prostaglandin E2 as a read out for endotoxin detection in a bovine whole blood assay. *ournal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2015; 38 (2): 196-198. <http://dx.doi.org/10.1111/jvp.12148>.

ANEXO C – MANUSCRITO SUBMETIDO - ALTEX

COMPARISON BETWEEN THE RESPONSES OF THE RABBIT PYROGEN TEST (RPT) AND THE MONOCYTE ACTIVATION TEST (MAT) INDUCED BY ZYMOSAN

Cristiane Caldeira da Silva¹; Octavio Augusto França Presgrave¹; Aurea Maria Lage de Moraes²; Thomas Hartung³, Isabella Fernandes Delgado⁴

¹ Department of Pharmacology and Toxicology, National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

² Laboratory of Taxonomy, Biochemistry and Bioprospection of Fungi, Oswaldo Cruz Institute (IOC) Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

³ Johns Hopkins University, Bloomberg School of Public Health, Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT), Baltimore, USA

⁴ Vice Director of Research, Education and Strategic Projects, National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Summary

The pyrogen tests are safety assays performed in the routine of quality control of injectable products by regulatory agencies. Currently, there are three available testing possibilities: the Rabbit Pyrogen Test (RPT), the *Limulus* Amebocyte Lysate test (LAL, also known as BET - Bacterial Endotoxin Test) and test systems using human whole blood or human monocytes, called Monocyte Activation Test (MAT). Although LAL may be considered as a replacement of the animal test, it is not able to detect pyrogens other than endotoxin. The MAT is based on the human fever reaction and thus most closely reflects the human situation. The aim of this study was to compare the sensitivity between the responses of RPT and MAT induced by Zymosan to provide data, which may contributed to the MAT to be considered as a full replacement of RPT. In the current study, different Zymosan concentrations were assayed for MAT in parallel with RPT. Results showed that MAT was more sensitive than RPT and these findings demonstrated that MAT presented a good response to Zymosan and may be considered to replace RPT.

Keywords: pyrogen, parenteral drugs, Zymosan, endotoxin, monocyte activation test

1 - Introduction

Contaminations of parenteral drugs with pyrogens were considered a great health problem since these contaminants can induce inflammatory reactions, including a rise in body temperature, but also more severe adverse reactions, such as septic shock and even death may occur (Dinarello, 2004; Schindler et al., 2009). Pyrogens are usually detected in the Rabbit Pyrogen Test (RPT) or alternatively by the *Limulus* Amoebocyte Lysate assay (LAL, also known as Bacterial Endotoxin Test, BET), both with specific advantages and disadvantages (Hartung et al., 2000a; Schindler et al., 2009).

The rabbit test is considered as the gold standard, covers a broader range of substances, and it is able to detect endotoxin and non-endotoxin pyrogens (NEPs) but it is less sensitive than *in vitro* tests and it is animal consuming (Hartung et al., 2000b Nakagawa et al., 2002). The LAL test has not been able to fully replace the rabbit test, since it is defined not as a pyrogen test, but as an endotoxin test (Hasiwa et al., 2013). Further, it induces false positive results with glucan-like structures and many herbal medicines (Daneshian et al., 2006). Indeed, since these tests are based on the recognition of endotoxin by non human systems, they are unlikely to mimic exactly the human response to the same molecules. Therefore, as the LAL test is limited to endotoxins, the RPT must be used for the detection of NEPs (Nakagawa et al., 2002). It should be emphasized that in some cases, the *in vivo* test remains negative in response to NEPs that induce pyrogenic adverse reactions in humans (Hasiwa et al., 2013).

The ESAC Statement On The Validity Of In-Vitro Pyrogen Tests endorsed five cell-based *in vitro* pyrogen tests that were included in the European Pharmacopoeia, named Monocyte Activation Test (MAT) as a third method for detection of pyrogen (ICCVAM, 2008; European Pharmacopoeia, 2010; Perdomo-Morales et al., 2011). Despite the potential to detect all types of pyrogens, one identified limitation of the MAT is the lack of data to determine their responses and suitability for pyrogens other than endotoxins that are currently detected by the RPT. Nevertheless, according to the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), MAT cannot be considered a complete replacement of the RPT, due mainly to the lack of comparative data between the two methods. However, it can be employed as a substitute for detecting Gram-negative endotoxin in parenteral drugs on a case-

by-case basis (ICCVAM, 2008, Perdomo-Morales et al., 2011). The same position has been adopted by the US Food and Drug Administration (FDA) (FDA, 2009; Perdomo-Morales et al., 2011)

MAT is based on the proinflammatory cytokines release in response to any pyrogen presented in a concentration-dependent manner and the IL-1 β produced is measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Hartung and Wendel, 1996; Hoffmann et al., 2005). Human whole blood containing monocytes was chosen as an accessible source of primary human immune cells (Daneshian et al., 2010). The advantage is that all the immune cell types and serum components are present in their natural composition and sources of contamination or preactivation of the cells are reduced as no isolation procedures are required (Poole et al., 1988; Taktak et al., 1991; Eperon and Jungi, 1996; Hartung and Wendel, 1996; Hoffmann et al., 2005). Further, development and refinement of MAT by the introduction of a standardized freezing procedure using DMSO as a cryoprotective agent, allowed it became more standardized and more widely available (Schindler et al., 2006).

The best-known fever-inducing contaminant is a component of the cell wall of Gram-negative bacteria, i.e. endotoxin or lipopolysaccharide (LPS). Pyrogenic components of other sources are also important and include Gram-positive bacteria and its components like Lipoteicoic Acid (LTA), viruses and fungal components (Hasiwa et al., 2007; Schindler et al., 2009, Perdomo-Morales et al., 2011). Two classes of conserved surface structures of fungi have been proposed to be immune-stimulating non-endotoxins: glycans e.g., β (1-3) and β (1-6) glucans such as zymosan, laminarin, lichenan, and curdlan and structures containing fatty acids (Hasiwa et al., 2013). Zymosan is a kind of pyrogen derived from the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and induces immune responses associated with fungal infection. Consists of protein-carbohydrate complexes containing 50~57% 1 \rightarrow 3- β -glucan (Underhill, 2003; Punsmann et al., 2013), which is an important contaminant for the some biological products like Human Serum Albumin (HSA) (Perdomo-Morales et al., 2011). The 1 \rightarrow 3- β -glucan is a polymer of D-glucose, which comprise a major structural component of fungal cell walls and have been identified as a major reticulo endothelial-stimulating component in Zymosan. It binds to Toll-Like Receptor 2 (TLR 2) at the surface of monocytes and thereby induces the expression of proinflammatory cytokines like Interleukin-1 β and Interleukin-6 (Young et al., 2001).

The aim of this study was to compare the sensitivity between the responses of RPT and MAT induced by Zymosan to provide data which may contribute to the MAT to be considered as a replacement of RPT.

2 - Materials and methods

Immune Stimuli

Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) and Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, Deisenhofe, Germany) were used. All of them were diluted in non pyrogenic 0.9% sodium chloride solution (Halex Istar, Goiânia, Brazil). We compared 1,000 to 5,000 ng/ml of Zymosan in RPT and MAT. Since usually the nature of the Zymosan in a preparation being examined is unknown, the level of contamination is expressed in endotoxin-equivalent units, derived by comparison with responses to standard endotoxin dose-response curve 0,025 a 1 ng/mL (or 0,125 to 5 UE/mL).

Blood samples

Heparinized blood samples were collected from 4 healthy donors. Differential blood cell counts were routinely performed with a Cell Counter (Hemogram 60 BioClin) to exclude donors with acute infections. Under sterile conditions the blood was supplemented with 10% (v/v) Dimethylsulfoxide (Wak Chemie Medical GmbH, Steinbach, Germany) and Sørensen Buffer (Acila AG, Mörfelden Walldorf, Germany) as described by Schindler et al. (2006). The pool of blood from the four volunteers was aliquoted in pre-cooled cryotubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) and directly frozen at -80°C . This pooled cryo-preserved blood was used for all experiments.

Whole blood incubation

Human whole blood incubations were performed as described previously in European Pharmacopoeia. Heparinized cryo-preserved whole blood was diluted with 900 μL to saline and stimulated with 100 μL of LPS or Zymosan in polypropylene vials (Eppendorf, Hamburg,

Germany). After incubation for 16 h at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, the vials were closed and stored at -20°C until cytokine measurement.

Cytokine determination

Commercially available Interleukin-1 β and Interleukin-6 ELISA kits (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) with a sensitivity range from 3.9 to 250 pg/ml for IL-1 β and 3.12 to 300 pg/mL for IL-6, were used. The data are mean \pm SEM of 4 replicates. The limit of detection (LOD) was determined using the endotoxin standard curve (0,125 to 5 EU/mL) and the concentration of endotoxin should correspond to the cut-off value. The cut-off value was expressed in optic density (OD) and it was calculated using the mean of the 4 replicates for the responses to the blank plus three times the standard deviation (sd) of the 4 replicates of the responses to the blank.

Rabbit Pyrogen Test

Twenty-two healthy male New Zealand white rabbits weighing not less than 1.5 kg were used. Animals were kept at individual cages, in ventilated racks, with 12/12 hours light-dark cycle, 20 \pm 2°C, 50-70% humidity, receiving autoclaved hay as environmental enrichment. For RPT, animals were selected and acclimatized in Polyvinylchloride cages, placed in climate-controlled room. The animals were obtained from Laboratory Animals Breeding Center (Cecal/Fiocruz). All animal experimentations were carried out in accordance with approved institutional protocols. by Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from Fiocruz and the recommendations outlined in the Brazilian Pharmacopeia.

The RPT was conducted with the same Zymosan concentrations used in the MAT. Animals received each selected Zymosan concentration (1mL/kg of body weight) injected into a marginal ear vein of each of three rabbits. After the injection, the rectal temperatures of the animals were recorded with a PyroMon® System (Ellab, Hillrod, Denmark) over a 3-h period. For each rabbit, the response was defined as the difference between the basal temperature (obtained prior to injection) and the maximum temperature recorded after Zymosan injection. When none of the rabbits showed a temperature increase \geq 0.5°C over its basal temperature, the Zymosan concentration tested was classified as non pyrogenic (NP). When only one rabbit showed a temperature increase \geq 0.5°C, the test was repeated (R) using five different rabbits. If

not more than three of the eight rabbits tested showed an individual temperature increase $\geq 0.5^{\circ}\text{C}$ and if the sum of the temperature increases in the eight rabbits did not exceed 3.3°C , the Zymosan concentration tested was classified as NP. Otherwise, the Zymosan concentration was classified as pyrogenic (P).

It is important to notice that complete RPT was performed only once, since following the test Pharmacopeial Monograph it is enough to determine pyrogenicity and in order to avoid the unnecessary use of animals.

Statistics

Mann-Whitney test (p value ≤ 0.05) was used to compare the means from different concentrations of Zymosan in the MAT. It was used the statistical software Prisma Pro version 6.0.

3- Results

According to the Brazilian Pharmacopoeia guidelines, the findings in the RPT showed that the 1,000 ng/mL/kg Zymosan concentration was considered non pyrogenic after the first test where none of animals showed temperature variation $\geq 0.5^{\circ}\text{C}$. On the other hand, when the rabbits received 2,500 ng/mL of Zymosan, results was considered sFAicious, since one of the animals showed temperature variation equal or higher than 0.5°C and it was necessary the retest, presenting the final result as non-pyrogenic. Only the 5,000 ng/mL/kg failed the RPT (see the resumed comparative study in tab. 1), i.e., this concentration showed pyrogenic response for both criteria, since 4 animals showed temperatures $\geq 0.5^{\circ}\text{C}$ (0.6°C ; 0.7°C ; 0.7°C and 0.5°C) and the sum of eight animal was $\geq 3.3^{\circ}$ ($\Sigma = 3.8^{\circ}\text{C}$).

For the MAT, the current study evaluated levels of interleukin (IL)-1 β and IL-6. First we determined the cut-off and LOD for IL-1 β and IL-6. The values were 0.238 and 0.233 for cut-off (OD) and 0.045 and 0.042 EU/mL for LOD respectively for the Il-1 β and Il-6. The linear quantification range for LPS (O55:B5) under our assay conditions was also determined. A linear relationship was found from 0.25 to 5 EU/ml from IL-1 β and 0.0625 to 5 EU/ml from IL-6. The correlation coefficient (r) for both curves was greater than 0.95 (plots not shown).

Results of Zymosan concentrations were compared in RPT and MAT with IL-1 β and IL-6 readouts (Table 1). It can be observed that 1,000 ng/mL showed non pyrogenic result in both assays but 2,500 ng/mL was considered pyrogenic in MAT while that RPT showed non pyrogenic result in the retest. The 5,000 ng/mL showed pyrogenic results in both assays.

((insert table 1 here))

These results can be strongly confirmed when compared in relation to standard endotoxin dose-response curve (figure 1). Cytokine release curve indicates that MAT is more sensitive in detecting Zymosan pyrogenicity, since it can detect the contamination earlier than rabbits.

((insert figure 1 here))

4 – Discussion

Results obtained in this study are fully encompassing some ICCVAM's directions when it is stated that "The RPT and *in vitro* pyrogen test results can be compared if the same substance is tested using both the *in vivo* RPT and *in vitro* methods (i.e., parallel testing data). However, because no RPT data were generated with the same test samples used in the *in vitro* test methods, the accuracy of the *in vitro* test results could not be compared directly with that of the RPT" (ICCVAM, 2008). In this study, both RPT and MAT were performed using the same solutions, as well as they were performed in parallel at the same time. This could reduce some interference and it allowed the comparison of results between both assays.

ICCVAM (2008) also states that "one identified limitation of the *in vitro* test methods is the lack of data to determine their responses to, and suitability for, pyrogens other than endotoxins that are currently detected by the RPT". In fact, few data may be found in the literature and, when it is found it is mentioned using MAT but not RPT (Hasiwa et al., 2007) whereas only one article present solely RPT data (Timm et al., 2008).

These results support previous studies as that conducted by Perdomo-Morales et al. (2011) that aimed to carry out a parallel comparison of RPT, LAL, and MAT as end-product pyrogen test for Human Serum Albumin (HSA) preparations. They evaluated the main source of contamination in blood-derived products, the (1,3) - β -glucans commonly used for clarification in cellulose membranes and one of the most component of yeasts. The LAL cascade is triggered by (1,3) - β -d-glucan and polysaccharides. Therefore, the authors concluded that neither the RPT nor the LAL is sufficiently reliable to guarantee consumer safety. Therefore, MAT is qualified to ensure consumer safety when it comes to pyrogenic contaminations other than LPS (Perdomo-Morales et al., 2011; Hasiwa et al., 2013). In addition, according to Hasiwa et al. (2013) both, RPT and MAT, showed 3-4 log-order differences in potency of different LPS samples. Notably, no such difference in potency was observed for the LAL, which differed by a maximum of one log-order (Hasiwa et al., 2013)

Fungi in general proved to be highly active in the whole blood test, though differences between distinct strains exist. Daneshian et al. (2006) used the MAT to evaluate the pyrogenic activity of fungal spores from more than 44 different pathogenic and non-pathogenic filamentous fungi and yeasts. In this approach MAT proved to be an adequate system for evaluating the pyrogenic potential of fungal stimuli, directly reflecting the human reactivity (Daneshian et al., 2006; Hasiwa et al., 2013). By the same way, our results showed that MAT is able to detect Zymosan, a non-endotoxin pyrogen, as well as it was detected by RPT. The difference of concentration detection is due to biological variation of rabbits and may also be explained by a higher sensitivity of MAT. By toxicological point of view, this higher sensitivity test can be seen as a safer tool to protect consumers.

5- Conclusions

Results showed that MAT was more sensitive than RPT and these findings demonstrated that MAT has a good response to pyrogens other than endotoxins, like Zymosan.

Since MAT has been already demonstrated to be effective to detect pyrogenic contaminations in some products and we have demonstrated that it is able to detect other pyrogen than endotoxin, MAT can be used for replacing rabbits with the advantage that it is derived from human tissues, which avoids potential uncertainty associated with cross-species extrapolation.

References

- Daneshian, M., Guenther, A., Wendel, A., et al. (2006). In vitro pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs. *J Immunol Methods* 313, 169-175. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2006.04.009>
- Daneshian, M., von Aulock, S., and Hartung, T. (2009). Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay. *Nat Protoc* 4, 1709-1721. <https://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.159>
- Dinareello, C. (2004). Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J. Endotoxin Res.* 10, 201-222. <https://dx.doi.org/10.1177/09680519040100040301>
- Eperon, S. and Jungi, T. W. (1996). The use of human monocytoid lines as indicators of endotoxin. *J. Immunol. Methods*; 194(2), 121-129. [https://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00073-7](https://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(96)00073-7)
- FDA (2009). Letter from Norris E. Alderson, PhD, FDA Associate Commissioner for Science, to RADM William S. Stokes, Director NICEATM.
- Hartung T. and Wendel, A. 1996. Detection of pyrogens using human whole blood. *In Vitro Toxicol.*; 9(4), 353-359.
- Hartung, T., Aaberge, I., Berthold S., et al. (2000a). Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. *ATLA*; 29, 99-123.
- Hartung, T., Fennrich, S., Fischer, M. et al. (2000b). Prevalidation of an alternative to rabbit pyrogen test based on human whole blood. *In: Balls M, van Zeller A.-M, Halder M E (Eds). Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation. Elsevier Science, Amsterdam.*
- Hasiwa, M., Kullmann, K., von Aulock, S., et al. (2007). An in vitro pyrogen safety test for immune-stimulating components on surfaces. *Biomaterials* 28, 1367-1375. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.016>

Hasiwa N, Daneshian M, Bruegger P, et al. (2013). Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEX*. 30(2), 169-208. <https://dx.doi.org/10.14573/altex.2013.2.169>

Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, et al. (2005). International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells. *J. Immunol. Methods*; 298(1-2):161-73. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2005.01.010>

ICCVAM (2008). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Validation Status of Five In Vitro Test Methods Proposed for Assessing Potential Pyrogenicity of Pharmaceuticals and Other Products.

Nakagawa Y, Maeda H, Murai T (2002). Evaluation of the in vitro test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with human blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*; 9(3), 588-597. <https://dx.doi.org/10.1128/CDLI.9.3.588-597.2002>

Perdomo-Morales, R., Pardo-Ruiz, Z., Spreitzer, I., et al. (2011). Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin. *ALTEX* 28, 227-235. <https://dx.doi.org/10.14573/altex.2011.3.227>

Pool E. J., Johaar, G., James, S., Petersen, I., Buic, P. (1998). The detection of pyrogens in blood products using an ex vivo whole blood culture assay. *J. Immunoassay*; 19(23), 95-111. <https://dx.doi.org/10.1080/01971529808005475>

Punsmann, S.; Liebers, V., Lotz, A., et al. (2013). Ex Vivo Cytokine Release and Pattern Recognition Receptor Expression of Subjects Exposed to Dampness: Pilot Study to Assess the Outcome of Mould Exposure to the Innate Immune System. *PLoS One*, 8 (12), 1-10. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082734>

Schindler S, Spreitzer I, Löschner B, et al. (2006). International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. *J. Immunol. Methods*; 316, 42-51. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2006.07.023>

Schindler, S., von Aulock, S., Daneshian, M., Hartung, T. (2009). Development, Validation and Applications of the Monocyte Activation Test for Pyrogens Based on Human Whole Blood. *ALTEX*; 26 (4), 265 - 277. <https://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.159>

Taktak, Y. S., Selkirk, S., Bristow, A. F., et al. (1991). Assay of Pyrogens by Interleukin-6 Release from Monocytic Cell Lines. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43: 578–582. <https://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb03540.x>

Timm, M., Bartelt, S., Moesby, L., Hansen, E.W. (2008). Cryopreservation of differentiated HL-60 cells for pyrogen testing. *Journal of Immunological Methods*, 339(2):146-52. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2008.09.005>

Underhill, D. M. (2003). Macrophage recognition of Zymosan particles. *Journal of Endotoxin Research*, 9 (3), 176:180. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2000000300009>

Young, S. H., Ye, J., Frazer, D. G. et al. (2001). Molecular Mechanism of Tumor Necrosis Factor- α Production in 133-b-Glucan (Zymosan) -activated Macrophages. *The journal of biological chemistry*, 276 (23), 20781–20787. <https://dx.doi.org/10.1179/096805103125001586>

Correspondence to:

Octavio Augusto França Presgrave.

Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Departamento de Farmacologia e Toxicologia. Avenida Brasil, 4365 – Manguinhos 21045-900 - Rio de Janeiro - RJ – Brazil. Tel.: +55 21 3865-5277. Fax: +55 21 2290-0915.

octavio.presgrave@gmail.com

Table 1 – Comparative results of pyrogen evaluation of Zymosan by Monocyte Activation Test (IL-1 and IL-6) and Rabbit Pyrogen Test. Results of MAT are expressed in Endotoxin Equivalent Units (EEU)/mL. NP – Non Pyrogenic; P – Pyrogenic; R – Retest. The values of MAT are the means of three replicates with standard error of the mean (SEM).

Zymosan ng/mL	RPT (°C)	RPT ($\sum \Delta T$) (°C)	MAT (IL-1 β) (EEU/ml) ^a	MAT (IL-6) (EEU/ml) ^a
Saline*	0,0; 0,0 ;0,1	0,1 ^{NP}	0,045 \pm 0,02 ^{NP}	0,042 \pm 0,01 ^{NP}
1000	0,40; 0,30; 0,30	1,00 ^{NP}	3,73 \pm 1,55 ^{NP}	3,96 \pm 1,4 ^{NP}
2500	0,30; 0,40; 0,50; 0,30; 0,40; 0,40; 0,00; 0,30	2,60 ^{R/NP}	5,46 \pm 2,27 ^P	6,01 \pm 1,82 ^P
5000	0,60; 0,30; 0,70; 0,30; 0,70; 0,30; 0,40; 0,50	3,80 ^{R/P}	9,74 \pm 2,97 ^P	11,72 \pm 2,07 ^P

^a The values are the means of three replicates with SEM.

* Negative control

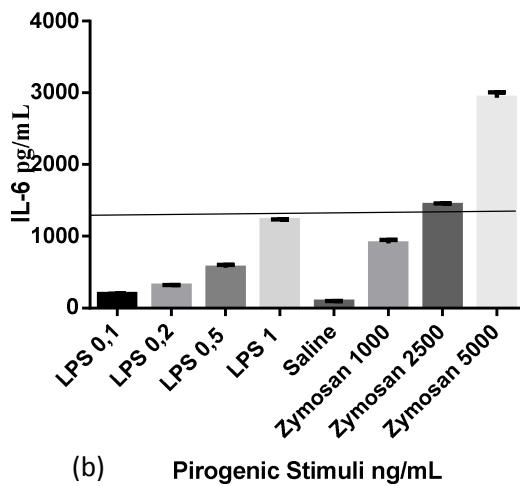
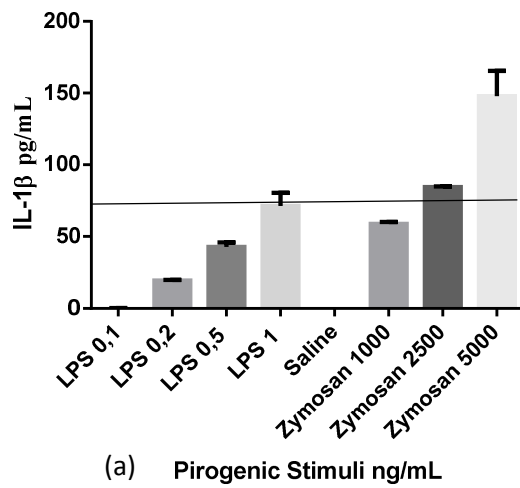


Figure 1: Response to the release of IL-1 β (a) and IL-6 (b) by different concentrations of Zymosan in cryopreserved blood. The line represents the cut off 1 ng/mL (5EU/mL) from LPS *E. coli* O55: B5, which correspond to the positive control. Statistics were calculated using Mann-Whitney test *p value $\leq 0,05$, data from three independent experiments.

.
+.
+.
+.

ANEXO D –ARTIGO PUBLICADO

Avaliação microbiológica da qualidade do ar de interiores: aspectos metodológicos e legais****Microbiological evaluation of indoor air quality: legal and methodological aspects***

Cristiane Caldeira
Octavio Augusto França Presgrave
Aurea Maria Lage de Moraes
Isabella Fernandes Delgado

Resumo

A contaminação microbiológica do ar de interiores é um grave problema de saúde pública por estar associada a alergias e a doenças respiratórias. O objetivo desta revisão foi apresentar e discutir os métodos utilizados na avaliação microbiológica da Qualidade do Ar de Interiores (QAI) e os aspectos legais em relação aos Valores Máximos Recomendáveis (VMR). A amostragem ativa por impactação em meio sólido tem sido o método mais utilizado, entretanto, diferenças metodológicas contribuem para a dificuldade de padronização dos VMR. Os testes in vitro são considerados uma nova ferramenta para esse tipo de avaliação, entretanto, faltam estudos que utilizem tais métodos para todos os tipos de ambientes. As limitações da Resolução RE nº 9/2003 indicam a necessidade de uma nova legislação principalmente para serviços de saúde.

Palavras-chave: Poluição do ar de interiores. Monitoramento ambiental. Bioaerossóis. Vigilância Sanitária.

Abstract

Th e microbial indoor air contamination is a serious public health problem since it is associated with allergies and respiratory diseases. Th is review aimed to present and discuss different methods used to evaluate the microbiological indoor air quality (IAQ) and the legal aspects related to maximum acceptable levels (MAL). Active air sampling by impactor sampler on a solid medium has been the most widely used method, however, differences between methods and difficulties in recovery of microorganisms contribute to the difficulty of standardizing MAL. Th e in vitro tests are considered a new tool for

* Artigo recebido em 07/2011
Aprovado em 03/2012

¹ Mestre em Ciências, Tecnologista Pleno em Saúde Pública, DFT/INCQS/FIOCRUZ. Av. Brasil 4365 - Manguinhos. Rio de Janeiro – CEP: 21040-900. Fone: (21) 38655277 Fax:(21)22900915.E-mail: cristiane.caldeira@incqs.fiocruz.br.

² Mestre em Ciências, Tecnologista Sênior em Saúde Pública, DFT/INCQS/FIOCRUZ.

³ Doutora em Biologia Celular e Molecular e Pesquisadora Titular IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

⁴ Doutora em Ciências, bolsista de Produtividade do CNPq e Vice-Diretora de Pesquisa e Ensino, INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

this type of evaluation, however, there are few studies that use these methods for all types of environments. The limitations of the Act nº 9/2003 indicate the need for new legislation mainly for health.

Keywords: Indoor air pollution. Environmental monitoring. Bioaerosol. Sanitary Surveillance. Introdução

Problemas relacionados à qualidade do ar de interiores (QAI) são mundialmente reconhecidos como um fator de risco para a saúde humana e uma importante questão de Saúde Pública (NUNES et al., 2005; QUADROS et al., 2009). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) apontou a poluição do ar de interiores como responsável por 2,7% dos casos de doenças respiratórias e alérgicas no mundo, causadas principalmente pela presença de bioaerossóis no ambiente (WHO, 2009).

Essas partículas são numerosas e diversificadas, compreendendo vírus, bactérias, esporos fúngicos, poeiras orgânicas, componentes da parede celular das bactérias Gram-negativas (endotoxinas) e Gram-positivas (ácido lipoteicoico), pelos de animais, pólen e poeira do ácaro doméstico (PANTOJA et al., 2007). Como consequência da presença dessas substâncias nas vias aéreas e circulação sanguínea, macrófagos e monócitos que expressam CD14 podem ser ativados iniciando uma cascata de transdução de sinal com liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios, especialmente IL-1 β , TNF- α e IL-6 (BERNASCONI et al., 2010; BONETTA et al., 2010).

Quando a exposição a esses agentes ocorre em áreas hospitalares, principalmente áreas críticas onde os pacientes possam estar imunossuprimidos, as consequências podem ser mais complexas levando ao agravamento da doença e em alguns casos ao óbito (NUNES et al., 2005; PEREIRA et al., 2005; ORTIZ et al., 2009; QUADROS et al., 2009). Da mesma forma, áreas laboratoriais que necessitem de ambientes estéreis devem ter um controle adequado para evitar a contaminação do ambiente e garantir a qualidade das análises (PASQUARELLA et al., 2000).

Ao contrário dos riscos químicos ou físicos, a avaliação da exposição aos riscos biológicos não possui metodologias e padrões referenciais adequados (NUNES et al., 2005; BERNASCONI et al., 2010). O procedimento de amostragem é realizado por coleta de ar e poeira de forma passiva e ativa, e muitos métodos diferentes podem ser usados na quantificação e na identificação desses microrganismos (PASQUARELLA et al., 2000). Essas diferenças contribuem para a dificuldade na comparação dos resultados e, conseqüentemente, para a padronização de Valores Máximos Recomendáveis (VMR), limites que separam as condições de ausência e presença do risco de agressão à saúde humana (NUNES et al., 2005). Recentemente, em estudos foram utilizados testes *in vitro* como a dosagem de mediadores inflamatórios no sangue total humano e linhagens celulares que respondem a todos os contaminantes biológicos presentes nas amostras de ar ou poeira, assim como métodos de dosagem de endotoxinas (KINDINGER et al., 2005; DANESHIAN; von AULOCK; HARTUNG, 2009; LIEBERS et al., 2009; SCHINDLER et al., 2009).

A concentração de microrganismos viáveis e cultiváveis, principalmente fungos totais e bactérias, é utilizada como padrão referencial microbiológico para avaliação da QAI. Esse padrão é um

parâmetro utilizado como sentinela para determinar a necessidade da busca das fontes poluentes ou das intervenções ambientais (BRASIL, 2003a; WHO, 2009). Um grande problema na determinação dos critérios de avaliação desses microrganismos, de forma a serem universalmente válidos, é a dificuldade de medição de uma resposta proporcional do corpo humano à contaminação externa. A concentração de microrganismos vivos e cultiváveis pode não representar o potencial risco biológico do ambiente devido à presença de outros contaminantes não mensuráveis pelos métodos disponíveis (SCHINDLER et al., 2009). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou, por meio da Resolução RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003, as orientações técnicas para os “Padrões Referenciais da Qualidade do Ar de Interiores em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo”. Nessa Resolução foi definido em termos de contaminação biológica apenas o VMR para fungos totais (BRASIL, 2003a; QUADROS et al., 2009). Devido à falta de legislação adequada, alguns estudos estabeleceram por meio de análises em áreas residenciais, ocupacionais e hospitalares, valores aceitáveis para a contaminação microbiológica que, juntamente aos valores estabelecidos por órgãos internacionais, servem para fins comparativos (DUTDIEWICZ, 1997; PASQUARELLA; PIZURRA; SAVINO, 2000; BOUILLARD et al., 2005). O objetivo desta revisão foi apresentar e discutir os diferentes métodos utilizados na avaliação microbiológica da QAI e os aspectos legais em relação aos VMR atualmente utilizados.

1 Amostragem e avaliação de bioaerossóis

O monitoramento de bioaerossóis inclui a medição de microrganismos viáveis (cultiváveis e não cultiváveis) e componentes ou partes desses microrganismos por coleta passiva e ativa. Entretanto, a maioria dos métodos empregados representa apenas aproximações da concentração de fungos ou bactérias em ambientes reconhecidamente contaminados (PASQUARELLA; PIZURRA; SAVINO, 2000; KINDINGER et al., 2005).

O método de coleta passivo ou método gravitacional é realizado por sedimentação de microrganismos dispersos no ar em placas de Petri com meio de cultura específico e posterior contagem de UFC por superfície ou por tempo de amostragem (UFC/dm² e UFC/h). É considerado um método limitado devido principalmente à falta de padronização do tempo de exposição, o que limita a quantificação desses microrganismos (PANTOJA; COUTO; PAIXÃO; 2007). Além disso, a coleta passiva possui baixa sensibilidade para pequenas partículas como esporos que não se depositam somente pela ação da gravidade e pode sofrer influência direta da movimentação do ar no ambiente avaliado (NUNES et al., 2005). Entretanto, devido a sua simplicidade, baixo custo e o fornecimento de informações qualitativas sobre a exposição, ainda é utilizado principalmente para monitorar salas limpas e ambientes controlados (PASQUARELLA; PIZURRA; SAVINO, 2000).

Na amostragem ativa são utilizados equipamentos que coletam um volume conhecido de ar direcionado em um meio nutriente por diferentes técnicas, quantificando os padrões referenciais a partir da contagem de UFC/m³. Os processos mais utilizados são por impactação em meio sólido por amostradores do tipo linear de 1, 2 ou 6 estágios, que podem simular o trato respiratório humano em

função do tamanho das partículas retidas (PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000; NUNES et al., 2005). Apesar da vantagem de se determinar o número de partículas respiráveis e, portanto, seu potencial em causar infecções, os impactadores de múltiplos estágios são menos precisos, possuem um maior custo e são mais difíceis de serem manuseados do que os de um estágio (NUNES et al., 2005).

Outras técnicas por amostragem ativa podem ser utilizadas como a impactação em meio líquido e por centrifugação, filtração (através de um filtro de membrana) e precipitação eletrostática (Tabela 1). A determinação da estimativa de poeira no ar por métodos gravimétricos também tem sido utilizado; entretanto, somente a quantidade de poeira não fornece nenhuma indicação de atividade biológica dos componentes presentes na amostra (NUNES et al., 2005; QUADROS et al., 2009).

O emprego de diferentes tipos de amostragem, técnicas e equipamentos podem influenciar a quantificação dos microrganismos presentes no ambiente, gerando problemas na avaliação dos resultados em função dos diferentes níveis de eficiência e custo. A dificuldade de comparação de resultados dependendo do método de amostragem foi apresentada em avaliações de salas cirúrgicas demonstrando que o número de UFC/m³ de espécies patogênicas obtidos com o método de sedimentação foi em média inferior aos encontrados por impactação (FLEISCHER et al., 2006).

A identificação dos microrganismos presentes no ambiente também é uma tarefa difícil e extremamente trabalhosa. Podem ser utilizados métodos morfológicos e de coloração por microscopia clássica e dosagens de componentes químicos como ATP, enzimas e DNA por metro cúbico de ar (ACGIH, 1989; PASQUARELLA; PIZURRA; SAVINO, 2000). A utilização da microscopia eletrônica ou por varredura, fluorescência e técnicas de biologia molecular ou imunológica como citometria de fluxo, reação em cadeia da polimerase em tempo-real, análise do polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática e ensaios imuno-enzimáticos também são ferramentas importantes na identificação tanto dos microrganismos vivos como partes ou constituintes desses contaminantes. Certas espécies de microrganismos de crescimento lento podem ser demasiadamente exigentes para crescer em cultura de laboratório sendo difíceis de serem identificadas (PASQUARELLA; PIZURRA; SAVINO, 2000; LIEBERS et al., 2009). Métodos de cultura tradicionais provaram ser de uso limitado para avaliação da exposição, fornecendo dados quantitativos de pouca reprodutibilidade, selecionando determinadas espécies em função do método de amostragem e meios de cultura específicos (WHO, 2009). Além disso, os métodos existentes nem sempre permitem a coleta ideal de microrganismos, bem como partes deles, que são reconhecidamente importantes na contaminação do ar ambiente e que se relacionam com efeitos à saúde humana, por exemplo, as endotoxinas (SCHINDLER et al., 2009).

Tabela 1: Comparação entre as coletas de ar por amostragem ativa e passiva

	AMOSTRAGEM PASSIVA	ATIVA
	-Qualitativa;	-Quantitativa;
	-Microrganismos viáveis e cultiváveis.	-Permite a detecção de microrganismos viáveis e cultiváveis partes desses microrganismos;
ANÁLISES		-Possibilidade do uso de métodos <i>in vitro</i> : *LAL: solução após lavagem do filtro amostrado para detecção de endotoxinas; - *TAM: contato direto do filtro amostrado com sangue total humano fresco ou cultura de linhagens monocíticas. Dosagem de citocinas para contaminantes biológicos em geral.
	-Baixo custo;	-Preconizada por diretrizes oficiais;
	-Maior disponibilidade de uso;	-Mais sensível;
VANTAGENS	-Maior número de análises em menor tempo.	-Permite avaliação de partículas de vários tamanhos incluindo as alveolares.
	-Difícil de manter na variedade de equipamentos de detecção de partículas dos resultados;	
DESVANTAGENS	pequenas como esporos fúngicos;	
	-Influência do tempo de amostragem que não é definido.	-Necessidade de constante calibração do equipamento.

*LAL- Lisado dos Amebócitos de Limulus; TAM – Teste de Ativação de Monócitos.

A contagem de fungos totais, apesar de ser um padrão referencial que melhor representa o nível de ocupação do ambiente e recomendado pela Resolução RE 09/2003, pode não ser o mais adequado para os hospitalares, por exemplo, nos quais, bactérias são responsáveis por grande número de infecções (BRASIL, 2003a; NUNES et al., 2005; QUADROS et al., 2009). Alguns estudos demonstraram que quantidades significativas de bactérias e leveduras podem crescer em meios específicos para fungos, necessitando ser esclarecido se a contagem deve ser somente de fungos filamentosos ou se as leveduras devem ser incluídas (QUADROS et al., 2009; DASCALAKI, 2009). Recentemente, novos estudos comprovam a importância do uso de métodos toxicológicos *in vitro* que avaliem a atividade biológica e tornem possível a quantificação de todos os contaminantes biológicos presentes no ar ambiente (LIEBERS et al., 2009; SCHINDLER et al., 2009; BERNASCONI et al., 2010) e sua relação com doenças respiratórias (CASTRO et al., 2005). Dentro desse contexto, no qual a amostragem e a análise da qualidade do ar são os primeiros passos para determinar se o ambiente apresenta uma ameaça potencial para as pessoas expostas, os modelos *in vitro* contribuem como uma importante ferramenta nas amostragens de medição (KINDINGER et al., 2005; BLAAUBOER, 2008; BERNASCONI et al., 2010).

As metodologias empregadas são adaptações de métodos utilizados para a avaliação de contaminantes biológicos em produtos injetáveis de uso humano e recentemente incorporados na Farmacopeia Europeia especificamente para esses produtos (BERNASCONI et al., 2010). A amostragem do ar é realizada por coleta ativa com o uso de bombas individuais com fluxo definido e sistemas coletores formados por cassetes e filtros específicos (DANESHIAN; von AULOCK; HARTUNG, 2009).

Atualmente, dois métodos *in vitro* têm sido utilizados: o Teste de Endotoxina Bacteriana e o Teste de Ativação de Monócitos (KINDINGER et al., 2009). O Ensaio de Endotoxina Bacteriana é baseado na reação do lisado de amebócitos do caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*) com a endotoxina e por isso também conhecido como Lisado de Amebócitos do *Limulus* (LAL). Para a análise deve ser realizada a lavagem dos filtros, cujo extrato é centrifugado e usado para dosar especificamente endotoxinas por uso de kits comerciais, sendo sua potência expressa em unidades de endotoxina (UE)/m³ de ar ou UE/mg de poeira. O resultado deve ser sempre comparado ao segundo padrão internacional de endotoxina (*Escherichia coli* sorotipo O113: H10). Assim, esse ensaio reflete apenas uma pequena parte do todo espectro de microrganismos transportados por via aérea. Além disso, como a endotoxina é medida apenas na forma livre, complexos formados com proteínas e outras partículas contidas nos bioaerossóis como fungos, glicanos e DNA são interferentes nesse ensaio, que tem também como limitação o fato de não poder ser usado diretamente em amostras sólidas como poeiras e particulados e nem amostras que possuam alguma coloração (SCHINDLER et al., 2009). Além disso, estudos em ambientes domésticos indicam que a atividade biológica encontrada em extratos de poeira não é mediada apenas por endotoxina, e sim por bactérias Gram-positivas e outros contaminantes que não são detectados por LAL (LIEBERS et al., 2009).

Devido às limitações do LAL, foi desenvolvido o Teste de Ativação de Monócitos que detecta todos os tipos de contaminantes biológicos por meio da dosagem de mediadores inflamatórios em

sangue total humano (TNF- α ; IL1- β e IL-6) e culturas de células monocíticas, principalmente a MonoMac 6, após contato direto do sangue humano com o filtro amostrado. Os resultados são expressos em unidades equivalentes de endotoxina (UEE)/m³ de ar sempre comparado ao padrão internacional de endotoxina da OMS (RIEHELMANN et al., 2007; BERNASCONI et al., 2010). A vantagem dessa metodologia reside no fato de refletir a carga biológica presente no ambiente independentemente da sua origem, incluindo microrganismos viáveis cultiváveis e não cultiváveis e substâncias potencialmente alergênicas (DANESHIAN; von AULOCK; HARTUNG et al., 2009; KINDINGER et al., 2009; SCHINDLER et al., 2009; LIEBERS et al., 2009; BERNASCONI et al., 2010). Algumas críticas dizem respeito ao perfil individual de liberação de citocinas dos doadores, já que essa resposta pode ser influenciada por fatores como ritmo circadiano, polimorfismo genético do receptor TLR4, além da dificuldade de obtenção de quantidades significativas de sangue de apenas um doador. Entretanto, segundo Schindler et al. (2009), a utilização do pool de sangue de 3 a 5 doadores, assim como a criopreservação do sangue podem contornar esse problema diminuindo as diferenças interindividuais entre os doadores.

A dosagem de mediadores inflamatórios no sangue total humano de trabalhadores expostos à Sílica foi utilizada por Castro et al. (2005) como indicador de predição para a fibrose pulmonar. Nesse estudo, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa nas médias de IL-1 β , TNF- α e IL-6 entre o grupo exposto e o não exposto, apontando a possibilidade do uso dos níveis de citocinas como um biomarcador da gravidade da fibrose pulmonar causada pela exposição à Sílica.

2 Normas, diretrizes e aspectos legais sobre a QAI

Devido ao grande número de contaminantes e poluentes existentes no ar de interiores e seus efeitos adversos, várias normas e diretrizes foram elaboradas por uma variedade de agências não havendo tanto consenso mundial quanto harmonização de metodologias (QUADROS et al., 2009).

Grande parte dos parâmetros definidos para QAI no Brasil são extrapolações dos limites estabelecidos por órgãos internacionais e normalmente relacionados a ambientes ocupacionais para parâmetros físicos e químicos (BRICKUS; AQUINO NETO, 1999). Para tal, são utilizados: os limites para ambientes urbanos definidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency - EPA) e OMS; os valores de referência do Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos (National Institute for Occupational Safety and Health - NIOSH) e os limites de exposição ocupacional (Occupational Exposure Level - OEL) adotados pela Administração de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos (Occupational Safety and Health Administration - OSHA) (QUADROS et al., 2009). No caso da avaliação dos riscos biológicos, as normas e diretrizes variam entre os órgãos e agências regulatórias assim como VMR (tabela 2).

Tabela 2: Normas e diretrizes de órgãos governamentais, agências regulatórias e estudos científicos para avaliação de bioaerossóis

AGÊNCIAS E ÓRGÃOS REGULATÓRIOS			
REFERÊNCIA	AMBIENTE	PADRÃO REFERENCIAL	VALOR
ACGIH	Ocupacional OEL	Fungos	250 UFC/m ³
NIOSH	Ocupacional OEL	Microrganismos totais	1000 UFC/m ³
OMS	Limites para ambientes urbanos	Fungos	500 UFC/m ³
ANVISA	Ambientes coletivos VMR	Fungos totais	750 UFC/m ³
NRCC	População não exposta	Fungos totais	150 UFC/m ³
	VR	Fungos anemófilos	100 UFC/m ³
ARTIGOS CIENTÍFICOS			
DUTKIEWICZ, 1997	Ocupacional - OEL	Microrganismos totais	10 ⁴ UFC/m ³
DACARRO et al.(2000)	Ambientes coletivos GIMC	Microrganismos totais	1000 GIMC/m ³
PASQUARELLA et al. (2000)	Hospital-IMA	Microrganismos totais	Alto risco 25 UFC/h
			Médio risco 5 UFC/h
			Baixo risco 750 UFC/h
GÓRNY e DUTKIEWICZ (2002)	Ocupacional (poeira orgânica) OEL	Fungos	5 × 10 ³ UFC/m ³
		Bactéria	100 × 10 ³ UFC/m ³
		Endotoxina(LAL)	2000 UE/m ³
	População não exposta RLV	Fungos	5 × 10 ³ UFC/m ³
		Bactéria	5 × 10 ³ UFC/m ³
		Endotoxinas (LAL)	50 UE/m ³
KINDINGER et al. (2005)	Criadouro de animais	Aves	Contaminantes biológicos (TAM) 7,5 x 10 ³ a 3,8 x 10 ⁵ UEE
		Estábulo	Contaminantes biológicos (TAM) 0,1 a 16x10 ⁶ UEE/m ³
BERNASCONI et al. (2010)	População não exposta	Contaminantes biológicos (TAM)	150 UEE/m ³

ACGIH - Conferência Americana de Higienistas Industriais e Governamentais; NIOSH - Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos; OMS – Organização Mundial da Saúde; ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; NRCC - Conselho Nacional de Pesquisas Canadense; OEL- Limite de Exposição Ocupacional; GIMC – Índice Global de Contaminação Microbiana; IMA - Índice de Contaminação Aérea Microbiana; RLV - Valores Limites Residenciais; LAL – Lisado dos Amebócitos de Limulus; TAM- Teste de Ativação de Monócitos.

Alguns órgãos definiram padrões para níveis de fungos na população que permanece em ambientes fechados o ano todo e no ar em população não exposta, principalmente onde em decorrência das condições climáticas. No caso de exposições ocupacionais a bioaerossóis, não existem valores de OEL ou Limites de Tolerância (Threshold Limit Values - TLV) reconhecidos por órgãos regulatórios (PASQUARELLA; PIZURRA; SAVINO, 2000). O NIOSH preconiza até 1000 UFC/m³ como valor máximo recomendável (ROOS et al., 2004). Os valores de OEL de 104 UFC/m³, citados por Dutkiewicz et al. (1997) para os microrganismos totais estabelecidos em ambientes com grandes quantidades de poeira orgânica como na agricultura, têm sido utilizados para fins comparativos em alguns estudos. Algumas recomendações foram estabelecidas pelo Comitê sobre bioaerossol da Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais (American Conference of Governmental Industrial Hygienists - ACGIH), a qual, baseada em estudos anteriores, estabeleceu que a concentração de fungos anemófilos em ambientes externos “rotineiramente excede 1000 UFC/m³ e podem alcançar em média 10.000 UFC/m³ nos meses de verão”. Esse mesmo Comitê estabeleceu como OEL o limite de 250 UFC/m³ para ambientes fechados. A ACGIH também adverte que concentrações menores que 100 UFC/m³ podem ser consideradas insalubres em ambientes que atendam indivíduos imunossuprimidos (BOUILLARD et al., 2005). Portanto, a concentração de microrganismos presente no ambiente não deve apenas ser quantificada, mas avaliada também sobre seu potencial toxigênico, levando-se em consideração que a baixa concentração de microrganismos no ar, por si só, não indica um ambiente limpo e saudável (ACGIH, 1989).

Contudo, esse regulamento causou muita discussão e discordância entre os membros do grupo técnico e sem conclusões consensuais sobre VMR (BRASIL, 1998; GIODA e NETTO, 2003).

As principais resoluções partiram da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que publicou, a partir dessa portaria governamental, a Resolução RE nº 176 de 24 de outubro de 2000 com algumas orientações técnicas sobre “Padrões Referenciais da Qualidade do Ar de Interiores em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo”. Tal Resolução foi pioneira nessa área porque foram definidas as principais fontes de contaminação biológica de ar de interiores (bactérias, fungos, protozoários, vírus, algas pólen e artrópodes). Também foi definido em termos de contaminação biológica o VMR para contaminação microbiológica de fungos, a qual deve ser menor do que 750 UFC/m³, sendo inaceitável a presença de fungos patogênicos (QUADROS et al., 2009). Segundo Nunes (2005), esse limite foi alvo de críticas em relação à sua origem sem base científica já que foi obtido a partir da quantidade de esporos inalados de *Penicillium* sp, capaz de induzir um surto

asmático quando inalado em $7 \times 10^5/10 \text{ m}^3$ de ar por um indivíduo adulto sem estudos e critérios científicos que o correlacionem a potenciais efeitos a saúde humana. Além disso, também foi estabelecida nessa Resolução a relação I/E a qual deve ser menor ou igual a 1,5, em que I é a quantidade de fungos no ambiente interior e E é a quantidade de fungos no ambiente exterior. Também são determinados nessa Resolução valores de umidade relativa do ar, temperatura e contaminação química (BRASIL, 2000).

A Resolução RE nº 176/90 foi atualizada para a Resolução RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003 que está em vigor atualmente, sem alterações nos valores para contaminantes biológicos (BRASIL, 2003a; GIODA e NETTO, 2003). Esta Resolução apresentou o número mínimo de pontos de amostragem em função do espaço físico, o que gerou grande número de críticas em função do número reduzido de pontos exigidos por metro quadrado, por exemplo, em uma área de até 1.000 m^2 deve-se coletar apenas 1(um) ponto amostral (NUNES et al., 2005).

Existem ressalvas não contempladas na Resolução RE nº 09/03 que foram incluídas na consulta pública nº 109, de 11 de dezembro de 2003, a qual foi encerrada sem um consenso por parte dos pesquisadores e sociedade. Essa consulta intitulada “Orientação Técnica referente aos indicadores de qualidade do ar interior em ambientes de serviços de saúde” seria uma proposta para atualizar parâmetros biológicos, químicos e físicos, identificação das possíveis fontes poluentes e métodos analíticos. A proposta também reconhecia a falta de uniformidade de instalações de sistemas de climatização em serviços de saúde no Brasil por sua extensão territorial e diferenças econômicas e tecnológicas. Outro ponto a ser destacado é a delimitação de áreas de risco de ocorrência de infecções, classificadas em nível 0 (zero) (área onde o risco não excede àquele encontrado em ambientes de uso público e coletivo); nível 1 (área onde não foi constatado o risco relacionado a efeitos adversos, porém algumas autoridades, organizações ou investigadores sugerem que o risco deva ser considerado); nível 2 (área onde existem fortes evidências de risco de ocorrência de eventos adversos relacionados à qualidade do ar de seus ocupantes ou de pacientes que utilizarão produtos manipulados nestas áreas, baseadas em estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem delineados); e nível 3 (área onde existem fortes evidências de alto risco de eventos adversos de seus ocupantes ou de pacientes que utilizam produtos manipulados nestas áreas, baseados em estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem delineados). De acordo com esses níveis, foram estabelecidas contagens máximas de UFC cujo indicador de qualidade de ar ambiental interior é a contagem total de bactérias e fungos: a. nível zero $\leq 750 \text{ UFC/m}^3$; nível 1 = 500 UFC/m^3 , nível 2 = 200 UFC/m^3 e nível 3 = 50 UFC/m^3 . Esses valores foram baseados na norma da ABNT NBR 7256 sobre o tratamento de ar em estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS) e conseqüentemente nos tipos de filtros estabelecidos na norma (BRASIL, 2003b; PEREIRA et al., 2005). Apesar da necessidade de manutenção rigorosa do sistema de ar condicionado em clínicas e hospitais, essa consulta deveria ser adaptada à realidade dessas unidades de forma que um número maior desses estabelecimentos pudesse ser contemplado. Uma nova discussão sobre uma legislação específica para os serviços de saúde demonstraria a necessidade do estabelecimento de parâmetros para ambientes hospitalares, que deveriam ser enquadrados em uma categoria especial para a qualidade do ar de interiores pela importância da

participação do meio ambiente na transmissão de processos infecciosos em função de usuários mais susceptíveis.

3 Estudos científicos na adoção de valores limites para bioaerossóis

A necessidade de um maior número de estudos para o estabelecimento de valores limites para bioaerossóis, tanto em exposições ocupacionais quanto da população em geral, fez com que desde a década de 1980 surgissem propostas a partir de análises em diversos tipos de ambientes. Para ambientes considerados especiais ou críticos, como os serviços de saúde, foram padronizados limites máximos de UFC por amostragem passiva. Esses limites foram classificados em ótimos, aceitáveis e inaceitáveis para: i) enfermarias (0 a 450; 451 a 750 e acima de 750 UFC/dm²/h); ii) farmácia (0 a 100; 101 a 180 e acima de 180 UFC/dm²/h); iii) sala asséptica (0 a 50; 51 a 90 e acima de 90 UFC/dm²/h); iv) sala cirúrgica em repouso (0 a 4; 5 a 8 e acima de 8); e v) sala cirúrgica em atividade (0 a 60; 61 a 90 e acima de 90 UFC/dm²/h). Esse trabalho foi usado como base por Pasquarella et al. (2000) para estabelecer por meio de um modelo matemático, valores limítrofes de acordo com o risco ambiental para áreas hospitalares com o uso do Índice de Contaminação Aérea Microbiana (*Index of Microbial Air contamination* - IMA), calculado pela contagem das unidades formadoras de colônia. Segundo os mesmos autores, o risco pode ser classificado como: muito alto IMA até 5 UFC/h (salas ultralimpas, isolamento reverso, sala cirúrgica para prótese articular, sala para produção de soluções injetáveis); alto IMA até 25 UFC/h (salas limpas, centro cirúrgico, UTI, unidade de diálise); médio IMA até 50 UFC/h (enfermarias); e baixo IMA até 75 UFC/h (demais setores) (QUADROS et al., 2009).

Dacarro et al. (2003) estabeleceram um índice global de contaminação microbiana por metro cúbico de ar (*Global Index of Microbial Contamination* – GIMC/m³) de 1.000 GIMC/m³ após avaliação da qualidade do ar em edifícios com base nos resultados obtidos a partir de 226 escritórios. Esse índice, considerado um valor limite saudável para QAI em edifícios públicos, tem sido criticado por alguns autores que encontraram em 95,5% dos escritórios avaliados, valores de GIMC/m³ abaixo desse índice (BERNASCONI et al., 2010).

Uma importante proposta foi apresentada por Górny e Dutkiewicz (2002), na qual foram estabelecidos valores de OEL em ambientes industriais e valores limites residenciais (*Residential Limit Values* - RLV) em edifícios. Esses índices foram determinados para componentes de bioaerossóis mediante várias medidas de frações inaláveis por métodos de impactação para a quantificação de fungos e bactérias e o teste de LAL para endotoxinas. Para os RLV de bactérias mesofílicas totais e fungos, foi proposto o valor de 5×10^3 UFC/m³ e, para endotoxinas, 50 UE/m³. Para os ambientes industriais contaminados por poeira orgânica, foram determinados os valores de 100×10^3 UFC/m³ para bactérias mesofílicas totais, 50×10^3 UFC/m³ para fungos, 20×10^3 UFC/m³ para bactérias Gram-negativas e actinomicetos termofílicos e 2.000 UE/m³ para endotoxinas. Além disso, foi destacada a presença no ar interior de *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Coxiella burnetii*, microrganismos estabelecidos pela Diretiva 2000/54/CE da Comunidade Europeia como de risco 3 e 4,

e, portanto, independentemente da concentração, devem sempre ser inadmissíveis e resultar em ações preventivas (BRASIL, 2000).

Em outro estudo, Bouillard et al. (2005) apresentaram resultados de contaminação em edifícios públicos comparando o método de contaminação bacteriana coletada por amostragem ativa (428-2,511 CFU/m³) e os níveis de endotoxina na poeira pelo LAL (4,6-116,2 UE/mg). Os mesmos autores comparam seus dados a estudos anteriores, mas só para ambientes domésticos onde foram encontradas concentrações médias de 17,8 UE/mg na poeira de colchões e 18,6 UE/mg de pó de pisos e discute a falta de valores de OEL e TLV para avaliar o ambiente onde esses profissionais estão expostos. Em outro estudo, foi relatada uma média geométrica de 79,0 UE/mg em poeira residencial localizada em Boston, nos Estados Unidos.

Bernasconi et al. (2010) utilizaram o Teste de Ativação de Monócitos para avaliar salas de edifícios públicos comparando com a concentração no ar de fungos e bactérias por métodos microbiológicos clássicos. Os níveis de contaminantes em 95% dos escritórios não excederam 150 UEE/m³. Entretanto, os autores ressaltam que não há dados disponíveis a partir de locais de medição comparáveis, porque essa metodologia só foi aplicada para investigar a atividade dos bioaerossóis em criadouros de aves ($7,5 \times 10^3$ UEE/m³a $3,8 \times 10^5$ UEE/m³) e em estábulos (0,1 a 16×10^6 UEE/m³) (KINDINGER et al., 2009; BERNASCONI et al., 2010). Apesar de os autores concluírem que a capacidade inflamatória foi muito menor nos escritórios do que na criação de animais, faltam estudos que comprovem qual nível de contaminação pode ser relacionada a agravos à saúde, além de estudos em outros tipos de ambientes (BERNASCONI et al., 2010).

4 Considerações finais

Para garantir a confiabilidade dos métodos de medição a bioaerossol, torna-se necessário unificar a metodologia, recomendando em primeiro lugar o uso de métodos quantitativos que devem permitir a avaliação de todos os tipos de contaminantes biológicos. As limitações da Resolução RE nº9/2003 indicam a necessidade de uma nova legislação principalmente para serviços de saúde incluindo uma discussão sobre a aplicabilidade dos testes in vitro, assim como a necessidade de estudos com enfoque epidemiológico que contribuiriam para a revisão e estabelecimento de novos VMR.

Agradecimentos

PAPES/FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

Referências

- AMERICAN CONFERENCE OF INDUSTRIAL HYGIENISTS. Step two: On-site investigation, p. 1-8; Fungi, p. 1-10; Bacteria, p. 1-7. Committee on Bioaerosols. In: **Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment**, 1989.
- BERNASCONI, C. et al. D. Pyrogenic activity of air to characterize bioaerosol exposure in public buildings: a pilot study. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 571–577, jun. 2010. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02831.x
- BLAAUBOER, B.J. The contribution of in vitro toxicity data in hazard and risk assessment: current limitations and future perspectives. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 180, n. 2, p. 81-84, aug. 2008. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.05.008
- BONETTA, S. et al. Assessment of microbiological indoor air quality in an Italian office building equipped with an HVAC system. **Environmental Monitoring and Assessment**, Netherlands, v.16, n. 1-4, p. 473-83, Feb. 2010. doi: 10.1007/s10661-009-0761-8
- BOUILLARD, L. et al. Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Poland, v. 12, n. 2, p. 187-192, jul./dec. 2005.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 176, de 24 de outubro de 2000. Orientação Técnica sobre os Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 out. 2000. Seção 1, n. 2510, p. 32-33.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 09, de 16 de Janeiro de 2003. Orientação Técnica sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 10 jan. 2003a. Seção 1, n. p. 45-53, 2001.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 109, de 11 de dezembro de 2003. Proposta de resolução que dispõe sobre Indicadores da qualidade do ar ambiental interior em serviços de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 12 dez., 2003b.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério Público. Portaria nº 3.523 de 28 de agosto de 1998. Regulamento Técnico. Qualidade do Ar (Sistemas de Climatização). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 31 ago. Seção 1, p. 40-42, 1998.
- BRICKUS, L. S. R.; AQUINO NETO, F. R. A qualidade do ar de interiores e a química. **Química Nova**, São Paulo, v. 1, n. 22, p. 65-74, jan./fev.1999. doi: 10.1590/S010040421999000100013
- CASTRO, H. A.; TAMBELLINI, A.T.; NETTO, A. R.; DA SILVA, J. J. O. Study of the interleukin 1 and 6 and tumorous necrosis factors in workers exposed to silica. **Cadernos de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 785-798, out./ dez. 2005.
- CHARLES, K. et al. **Indoor Air Quality Guidelines and Standards**. National Research Council Canada, NRCC RR204, 2005. Disponível em: <<http://www.nrc-nrc.gc.ca/obj/irc/doc/pubs/rr/rr204/rr204.pdf>>. Acesso em: 6 jul. 2011.
- DACARRO, C. et al. Determination of aerial microbiological contamination in scholastic sports environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 904-912, nov. 2003. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02044.x
- DANESHIAN, M.; Von AULOCK; HARTUNG, T.

- Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay. **Nature Protocols**, London, v. 4, n. 12, p. 1709-1721, dec. 2009. doi: 10.1038/ nprot.2009.159
- DASCALAKI, E.G. Indoor environmental quality in hellenic hospital operating rooms. **Energy and Buildings**, Belgrade, v. 41, n. 5, p. 551-560, may 2009. doi: 10.1016/j. enbuild.2008.11.023
- DUTKIEWICZ, J. Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Poland, v. 4, n. 1, p. 11-16, jan./ jun.1997.
- GONTIJO FILHO, Paulo Pinto; SILVA, C. R. M; KRITSKI, A. L. Ambientes climatizados. Portaria 3.523 de 28/8/98 do Ministério da Saúde e padrões de qualidade do ar de interiores. **Jornal de Pneumologia**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 254-58, sep./oct. 2000. doi: 10.1590/S010235862000000500006
- FLEISCHER, M. et al. Microbiological control of airborne contamination in hospitals. **Indoor and Built Environment**, United Kingdom, v. 15, n. 1, p. 53-56, feb. 2006. doi: 10.1177/1420326X06062230
- GIODA, A.; AQUINO NETO, F.R. Poluição química relacionada ao ar de interiores no Brasil. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 359-365, may/jun. 2003. doi: 10.1590/ S0100-40422003000300013
- GÓRNY, R.L.; DUTKIEWICZ, J. Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in central and eastern European countries. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Poland, v. 9, n. 1, p. 17-23, jan./jun. 2002.
- KINDINGER, I. et al. A new method to measure air-borne pyrogens based on human whole blood cytokine response. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 298, n. 1-2, p.143-153, mar. 2005. doi: 10.1016/j.jim.2005.01.006
- LIEBERS, V. et al. Standardization of whole blood assay for determination of pyrogenic activity inorganic dust samples. **International Journal of Hygiene Environmental Health**, Germany, v. 212, n. 5, p. 547-556, sep. 2009. doi:10.1016/j. ijheh.2009.03.003
- NUNES, Z.G. et al. Indoor air microbiological evaluation of offices, hospitals, industries, and shopping centers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 351-357, jan./jul. 2005. doi: 10.1590/S007402762005000400003
- ORTIZ, G. et al. A Study of air microbe levels in different areas of an hospital. **Current Microbiology**, New York, n. 59, n. 1, p. 53-58, jul. 2009. doi: 10.1007/s00284-009-9398-7
- PANTOJA, L.D.M.; COUTO, M.S.; PAIXÃO, G.C. Diversidade de Bioaerossóis Presentes em Ambientes Urbanizados e Preservados de um Campus Universitário. **Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 41-47, jan./jun., 2007.
- PASQUARELLA, C.; PITZURRA, O.; SAVINO, A. The index of microbial air contamination. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 46, n. 4, p. 241-256, dec. 2000. doi: 10.1053/jhin.2000.0820
- PEREIRA, R.G. et al. Bioaerossóis bacterianos em um hospital. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 26, n. 1, p. 77-81, jan./mar. 2005.
- QUADROS, M.E. et al. Indoor air quality in hospitals: a case study and a critical review of current standards. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 431-438, jul./set. 2009. doi: 10.1590/S1413-41522009000300017

RAO, C. Y.; BURGE, H. A.; CHANG, J. C. S. Review of quantitative standards and guidelines for fungi in indoor air. **Journal of the Air & Waste Management Association**, Pittsburgh, v. 46, n. 9, p. 899-908, sep. 1996.

RIEHELMANN, H. et al. Differential response of Mono Mac 6, Beas-2B, and Jurkat cells to indoor dust. **Environmental Health Perspectives**, North Carolina, v. 115, n. 9, p. 1325-1332, Set. 2007. doi: 10.1289/ehp.9874

ROOS, C. et al. Studies on fungal and bacterial population of air-conditioned environments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, p. 827-835, set. 2004. doi: 10.1590/S1516-89132004000500020

SCHINDLER, S. et al. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. **Journal of Immunological. Methods**, Amsterdam, v. 316, n. 1-2, p. 42-51, oct. 2006. doi:10.1016/j.jim.2006.07.023

SCHINDLER, S. et al. Development, validation and applications of the Monocyte Activation Test for pyrogens based on human whole blood. **ALTEX**, Germany, v. 26, n. 4, p. 265-277, oct./dec. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Programmes and projects: Guidelines for indoor air quality: dampness and mould**, 2009. Disponível em: <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0017/43325/E92645.pdf>. Acesso em: 6 jul. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Indoor air quality: biological contaminants**. European Series, n. 31, Copenhagen, Denmark, 1988.

ANEXO E - MANUSCRITO A SER SUBMETIDO -**APPLICABILITY OF MONOCYTE ACTIVATION TEST (MAT) AS A TOOL TO ASSESS THE INDOOR AIR QUALITY (IAQ) IN LABORATORY AREAS: A PILOT STUDY**

Cristiane Caldeira da Silva¹; Octavio Augusto França Presgrave¹; Isabella Fernandes Delgado; Aurea Maria Lage de Moraes^{2,3}

¹ Department of Pharmacology and Toxicology, National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

² Laboratory of Taxonomy, Biochemistry and Bioprospection of Fungi, Oswaldo Cruz Institute (IOC) Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

³ Vice Director of Research, Education and Strategic Projects, National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

In many human activities, the presence of bioaerosols represent an important risk factor to human health. In recent years, the evaluation of the bioaerosols in places at risk as healthcare facilities is considered a basic step toward prevention. The aim of our study was to investigate indoor air quality (IAQ) by comparing pyrogen concentration and microbiological contamination in laboratory areas using the MAT as tool to assess the IAQ. Air samples were collected during cold and warm seasons in outdoor and indoor health places that included 3 Labs and 2 offices located in INCQS. The MAT (IL-1 β and IL-6) and fungi measured pyrogens by classical microbiology. It was found that outdoor fungal concentrations ranged from 673 to 1530 UFC/m³ and indoor ranged from 212 to 825 UFCm⁻³. It can be observed that 50% of the total of samples showed CFU m⁻³ values above recommended by the WHO and CEC (Threshold = 500 UFCm⁻³) and 10% above recommended by the ANVISA (threshold = 750 UFCm⁻³). It was found that outdoor pyrogenic activity ranged from 2,46 to 6,15 EUUmL⁻¹ for IL-1 β and from 3,23 to 6,41 EUUmL⁻¹ for IL-6. The indoor results ranged from 0,16 to 5,17 EUUmL⁻¹ for IL-1 β and from 0,49 to 5,7 EUUmL⁻¹ for IL-6. Higher values were recorded in fall following the same tendency of the fungi concentration. When we considered the value 0,5 UE/mL as positive control, 70% of the samples remained over this limit. The differences between the methodologies can be explained by the fact that the immune stimulatory potency is neglected in the CFU determinations. The MAT is a rapid, reliable tool for measuring

pyrogens that could be used as an indicator of IAQ. This is the first study on pyrogenic compound detection in laboratories using MAT, which could serve for developing future indoor air guidelines.

Keywords: monocyte activation test, indoor air, indoor fungi, interleukin-1 β and 6, pyrogen.

Correspondence

Cristiane Caldeira da Silva

Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4362, Manguinhos, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

e-mail: cristiane.caldeira@incqs.fiocruz.br

INTRODUCTION

In many human activities like hospitals, industry and agriculture, the presence of bioaerosols represent an important risk factor to human health and even an increase in human mortality. These included living and death microorganisms, components of the cell wall of Gram-negative bacteria (e.g. endotoxin, lipopolysaccharide), of Gram-positive bacteria (e.g. lipoteichoic acid), organic dusts or fungal spores and contribute for airway diseases and health effects (Kindinger et al, 2005; Liebers et al, 2008).

In recent years, the evaluation of the bioaerosols in places at risk as healthcare facilities is considered a basic step toward prevention (Pasquarella et al, 2007, Ortiz et al, 2009) and therefore measurement of bioaerosol exposure is highly recommended (WHO 2009; Cabral et al, 2010). However, there are still problems relating to methodology, monitoring, data interpretation and maximum acceptable levels of contamination (Pantoja, 2007, Pasquarella et al, 2007).

Many different sampling methods in use are based on impaction or filtration of air and the identification of live microorganisms by culturing. However, this method underestimates the total number of microbes in the air, since not all species grow on standard media. Moreover, the other problem was related to culturing times differ and overgrowth of slow growing species. One major problem in this field is the lack of a standardized relevant methodology measuring total inflammatory burden and the lack of accepted threshold values (Kindinger et al, 2005).

In according to the Commission of European Communities (CEC) report, exposures of non industrial *indoor* environmental were categorized into five levels: i. 0 to 25 0 CFU/m³, very low; ii. 25 to 100 CFU/m³, low; iii. 100 to 500 CFU/m³, moderate; iv. 500 to 2000 CFU/m³ high; and v. more than 2000 CFU/m³, very high (CEC, 1994). World Health Organization (WHO) defined 500 UFC/m³ as acceptable limits for urban environmental (WHO, 2009). In Brazil many parameters defined for IAQ are extrapolations established by international organizations. Due the limitations of the Act n° 9/2003 regulated by National Health Surveillance Agency (ANVISA), which establish technical guidelines for the "References Standards of Interior Air Quality in artificially conditioned environments for public and collective use" indicate the need for new legislation mainly for health. For that, maximum value for microbiological contamination is 750 colony-forming units per cubic meter (UFCm⁻³) for fungi and a relation of I/O (I is the quantify of fungi in door and O on the outdoor) that must be less than 1,5 and nonpathogenic or toxigenic fungi are allowed (ANVISA, 2003; Caldeira et al, 2012).

Nowadays, *in vitro* methods are be using to detect the presence of bioaerosols in the air (Kindinger, 2005, Liebers et al, 2009, Bernasconi et al, 2010). The Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay specifically measures endotoxins of Gram-negative bacteria; however, it reflects only a small part of the whole spectrum of air-borne micro-organisms. Also, fungal glucans and DNA interfere with endotoxin detection in the LAL assay (Kindinger et al, 2005).

Since 1995 was described, a method, for the detection of pyrogenic (fever-inducing) based on recognition these contaminants by immune cells initiates the release of many signaling molecules, such as cytokines and eicosanoids. In the blood, monocytes are the main producers of the proinflammatory signal molecule interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin (IL-6) and tumour necrosis factor (TNF- α), which can be analyzed by ELISA (Hartung and Wendel, 1996). This method known as Monocyte Activation Test (MAT) and had been incorporated in European Pharmacopoeia since 2010. Kindinger et al (2005) adapted this method to the measurement of air-borne pyrogens, however, until now; there is not being reliable data about the LPS limit concentration related to the action of pyrogen after inhalation exposure (Bernasconi et al, 2010).

Another aspect to be considered, MAT is used to evaluate highly contaminated environments as animal housing or buildings (Kindinger et al, 2005; Bernasconi et al, 2010) and missing data to evaluate the applicability of the MAT in areas with low contamination. Laboratories should be considered clean environmental since that the presence of microorganism, spores and others pyrogens can be contaminate surface and analyses, and the

indoor air quality (IAQ) is considered a basic step toward prevention. The aim of this study was to investigate indoor air quality (IAQ) by comparing pyrogen concentration and fungi contamination in laboratory areas using the MAT as tool to access the IAQ.

MATERIALS AND METHODS

2.1. Air sampling

Air was sampled between December 2013 and October 2014 in National Institute of Quality Control in Health (INCQS). Samples was collected in december, march, August and September and included: i. laboratories (Lab, A and B), ii. laboratory animal house room (LAH) and iii. offices (A and B), all of them in the warm and cold seasons. All collections has been done in locations where there is little circulation of people. Lab A was considered with the less possible chance of contamination than Lab B by the work character. LAH room is the location for preparation of samples can be used in pyrogen tests. It shoul be stressed that offices A and B are located in the basement of Institute. Measurements of temperature and relative humidity (RH) with a Thermometer-Hygrometer (Instrutherm Co.) have been carried out in each location before the collection of dates.

Sampling airborne moulds analysis

Airborne moulds was impacted with an impactor air samplers (MAS 100– MERCK®) operating at a flow rate of on potato-dextrose agar plates (PDA, Difco). The air sampling volume was 283 l/10 min and PDA plate was incubated at 25°C for 7 days. The resultant colonies were counted. Microbial counts were expressed as colony-forming units per cubic metre (CFU/ m³) of sampled air. The microbial counts was used for calculated Indoor/Outdoor (I/O) ratios. If I/O ratio of up to 1,5 the air quality was considered contaminated (ANVISA, 2003).

Air sampling and pyrogens detection by the MAT

Air was sampled with Personal Air Sampling Pumps (Model HFS-513 A, Gilian Sensidyne Switzerland) adjusted at flow rate of 1 lmin⁻¹ /4h in three replicate for spot. Air monitor cassettes of styreneacrylnitrile with a diameter of 37 mm with polytetrafluoroethylene filters (PALL Life Science) were used for collection. In our experiments, each whole blood incubation reaction included (i) a serial dilution of endotoxin controls performed in clean

reaction cassettes 0,025 a 1 ng/mL (or 0,125 to 5 UE/mL), (ii) a negative control with 0,9% sodium chloride solution (Halex Istar, Goiânia, Brazil) and (iii) samples. Instead of the WHO reference standard from *E. coli* O113:H10, we used the LPS from *E. coli* O55:B5 (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany), already calibrated against the WHO reference standard (Daneshian et al. 2009). Pyrogenic activity of air was expressed as endotoxin equivalent unit (EEU), where EEU means the IL-1 β and IL-6 released by blood cells equivalent to that produced in response to the reference LPS (0,5 EU/mL). This value was considered reference since that 5 EU/10mL of endotoxin which is the LPS limit concentration taken as the lowest dose that produce fever in rabbit and human (Hochstein, 1990).

2.2. Monocyte Activation Test

Blood samples

Heparinized blood samples were collected from 4 healthy donors. Differential blood cell counts were routinely performed with a Cell Counter (Hemogram 60 BioClin) to exclude donors with acute infections. Under sterile conditions the blood was supplemented with 10% (v/v) Dimethylsulfoxide (Wak Chemie Medical GmbH, Steinbach, Germany) and Sørensen Buffer (Acila AG, Mörfelden Walldorf, Germany) as described by Schindler et al. (2006). The blood from the four volunteers was aliquoted in pre-cooled cryotubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) and directly frozen at -80°C .

Whole blood incubation

Whole blood incubations in air monitor cassettes were carried out in a total volume of 3600 μL , being that from this total, 600 μl of cryopreserved human whole blood, 2700 μL of non pyrogenic 0.9% sodium chloride solution as medium (Halex Istar, Goiânia, Brazil) and 300 μl for samples and spike samples. The IL- 1 β and IL-6 response to the filters contaminated with air samples was compared with the response to a concentration–response curve to lipopolysaccharide (LPS) and clean filters. After incubation for 16h at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 , the vials were closed and stored at -20°C until cytokine measurement.

Cytokine determination

Commercially available Interleukin-1 β and Interleukin-6 kit (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) with a sensitivity range from 3.9 to 250 pg/ml for IL-1 β and 3,12 - 300 pg/mL for IL-6 were used. The data are mean \pm SD of 4 replicates.

LOD determination

The limit of detection (LOD) was determined using the endotoxin standard curve (0,125 to 5 EU/mL) and the concentration of endotoxin should correspond to the cut-off value. The cut-off value was expressed in optic density (OD) and it was calculated using the mean of the 4 replicates for the responses to the blank plus three times the standard deviation (sd) of the 4 replicates of the responses to the blank.

RESULTS

The concentrations of fungi in the indoor and outdoor environment for the samples of health places studied was be shown in Table 1. It was found that outdoor fungal concentrations ranged from 1350 to 1530 UFC/m³ in cold seasons and from 673 to 964 UFC/m³ in warm seasons. Higher values were recorded in fall and the Indoor results following the same tendency. It was found that indoor fungal concentrations ranged from 285 to 825 UFCm⁻³ in cold seasons and from 212 to 731 UFCm⁻³ in warm seasons. These results ratify previous studies whereas the fall is the season with the highest concentration of fungi (Burge et al, 2000; Menezes et al, 2004, Graudenz et al, 2005, Zihe et al, 2014).

When the results were evaluated separated by Laboratories (Lab A, B and LAH) and offices (A and B) we can be observed that the average of the offices showed fungi load higher than Labs, except on summer.

Due a lack of dates about recommended limits for laboratories and health places, we used of the CEC report, which considered that for exposures of non-industrial indoor environmental 500 UFCm⁻³ as limit for moderate exposed, which is the same value recommended for the WHO as acceptable limits for urban environmental. Maximum value for

microbiological contamination also was recommended by ANVISA as 750 UFCm⁻³ for fungi and a relation of I/O were used.

It can be observed that 50% of the total of samples showed CFU m⁻³ values above recommended by the WHO and CEC (Threshold = 500 UFCm⁻³) and 10% above recommended by the ANVISA (threshold = 750 UFCm⁻³). When the results were separate by seasons, on the spring 40% of the samples represented by the two offices showed CFU m⁻³ values above recommended by the WHO and CEC . On the summer only lab B, showed high count of fungi, which was, considered over the WHO, CEC and ANVISA limits. The collected carried out in fall can be worse, whereas all of the samples showed fungi count above the recommended by WHO and CEC and 40% represented by Lab B and Office B by ANVISA. For the samples collected in winter, only laboratory B showed high values.

In addition to maximum fungi contamination others parameters as humidity and indoor temperature were evaluated for good air quality (table 1).

Table 1: Fungi in indoor and outdoor environmental.

Locations	Spring			Summer			Fall			Winter		
	CFU m ⁻³	RH (%)	Temp (C°)	CFU m ⁻³	RH (%)	Temp (C°)	CFU m ⁻³	RH (%)	Temp (C°)	CFU m ⁻³	RH (%)	Temp (C°)
Outdoor	873	51,6	26,3	964	73,1	29,7	1530	71	23	1350	62,6	22,3
LabA	235	63,4	20,2	212	63,8	23,1	660**	72,9	19,3	450	62,1	22,5
Lab B	390	63,1	23,1	731**	74,3	22,1	825***	70,3	22,6	535**	74,3	20,5
LAH	230	64,6	22,6	424	61,4	20,2	675**	77,1	22,8	285	61,2	21
Office A	540**	72,1	21,3	376	63,4	21,5	510**	75,9	21,7	470	67,2	20,9
Office B	520**	71,5	22,1	329	60,9	22,2	750***	75,8	20,2	580**	72,1	21,5

CFU m⁻³, Relative Humidity (RH, %) and Temperature (Temp, °C) relating to the spot sample in day of collection.

** Indoor values over the recommended by the WHO

*** Indoor values over the recommended by the WHO and ANVISA

The Relative Humidity (RH) of the air is just as important parameter. In the United States, the Act n°55/1994 of the American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers (ASHRAE) recommends keeping the relative humidity between 30 and 60 percent. Above 60 percent, fungi start to become a problem for human health (WHO, 2008). Pasanen et al. (1991) found that temperature of 21–30°C and relative humidity of 75-92% could

induce a rapid fungal germination and growth. Therefore, it is considered that bioaerosols are much easier to grow in areas with humid and warm climate (Ponce-Caballero et al, 2010). The Act 09/2003 of the ANVISA established from 40 to 65% on the summer and 35 to 65% on the winter as operational range. Our results demonstrated that all samples independently of the season showed HR over than 60% and the results indicated that when the RH is over 65% can be related with high count fungi. The indoor temperatures were satisfactory remaining from 20 to 23 °C.

Moreover, our results suggested that the increase of outdoor concentrations resulted in a corresponding increase of indoor concentrations in most locations. In all the places health under investigation, the fungi load were lower indoor than outdoors, representing 21-53% of the outdoor concentration. The indoor/outdoor ratios (I/O) for fungi are shown in Table 2.

Table 2: Indoor/Outdoor ratios for fungi calculated in INCQS

Places	Spring (UR 51,6%- 26,3° C)	Summer (UR 73,1% - 29,7° C)	Fall (UR 71%- 23 ° C)	Winter (UR 62,6%- 22,3° C)
lab A	0,34	0,21	0,39	0,43
lab B	0,57	0,77	0,25	0,53
laboratory animal house	0,34	0,43	0,21	0,49
office A	0,8	0,18	0,34	0,46
office B	0,77	0,13	0,42	0,48

In Brazil when I/O is higher than 1,5 a diagnostic of the pollution sources has to be made and correctives measures implemented. However, values rather than 1 indicated that particles found inside have the highest quantity those found outside. Caballero et al (2010) considered the I/O ratios for fungal less than 1 (one). This value indicated a balance between the particles found inside with those found outside. In this study all of samples showed values for I/O ratios less than 1.

However, only airborne fungal contaminations is insufficient for the full assessment of the pyrogenic activity. The fact that the immune stimulatory potency of the different germs

varies from species to species, that not all bacteria grow on standard agar plates, and that the presence of non-living inflammatory material is neglected in the CFU determinations.

The Pyrogenic activity of indoor bioaerosols were taken in MAT varying the sampling time at ten minutes and 2,4, 6 and 8 h in one office (A) for evaluating the pyrogen concentration, using IL1 β as readout, and to avoid cell blood response saturation (figure 1). The results show that, IL-1 β values increased in the samples (average values for 10 min, 2 and 4 h, respectively: 0,065; 0,367; and 0,63 EUUml⁻¹) as the sampling time increased as expected. Therefore, from 4 hours, the pyrogenic activity reach a plateau that could be represent a cell blood response saturation. Kindinger et al, (2005) showed that value after 15 min of sampling is not higher than after 10 min in contaminated environmental, like a places in a farm. This implies that some form of saturation does eventually take place. This may result from saturation of the filters, saturation of the blood cells or saturation of the ELISA. Bernasconi et al (2010) collected air was sampled in modern buildings with no sign of damp. Triplicate samples were taken at 4, 8 and 24 h in one office per building, to evaluate the pyrogen concentration diurnal trend, which the outdoor samples were taken for 4 h to avoid cell blood response saturation. These limitations of the test will need to be defined more closely in further experiments to set guidelines for the measurement in different environments.

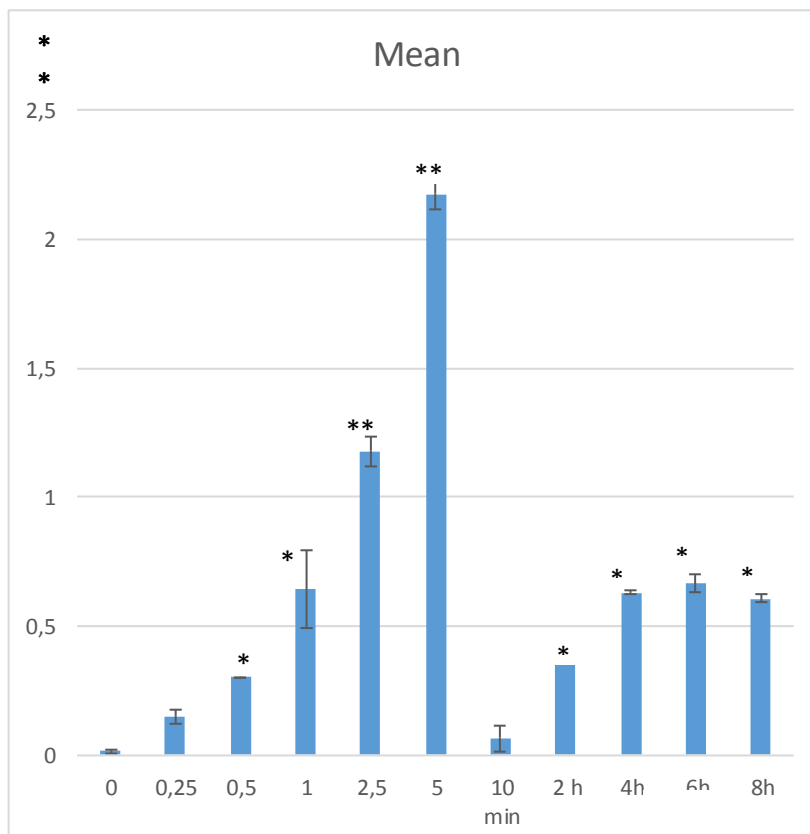


Fig 1. Release of IL-1 β in human whole blood induced by defined LPS concentrations on PTFE membranes in air sampling monitors (n=3 \pm S.D, left half) or contaminated in an Office A (n=3 \pm S.D, right half) by collecting 10 min and 2, 4, 6 and 8 hours at 1 l/min. *pb0.05; **pb0.01 vs. Control

In line with microbiological results, in all the places under investigation, the pyrogenic activity of the air were lower in the indoors than outdoor, representing 14-89% of the outdoor concentration (table 3). In the warm seasons, the indoor concentrations represented on average 16,6 -61% of the outdoor concentration for IL1 β and 14 – 59,4% for IL-6. In the same way, in the cold seasons the indoor concentration represented 17,5 – 84% for IL-1 and 18– 89% for IL-6. The dates related to results of filters collected in the same locations and day of the fungi plates. Results are expressed in EEUmL⁻¹, where EEU means the IL-1b and Il-6 released by blood cells equivalent to that produced in response to the reference LPS. The data are mean \pm SD of 3 samples/room, of 3 replicates.

Table 3: Potential inflammatory capacity (EEU m⁻³) in samples collected in the investigated laboratory rooms.

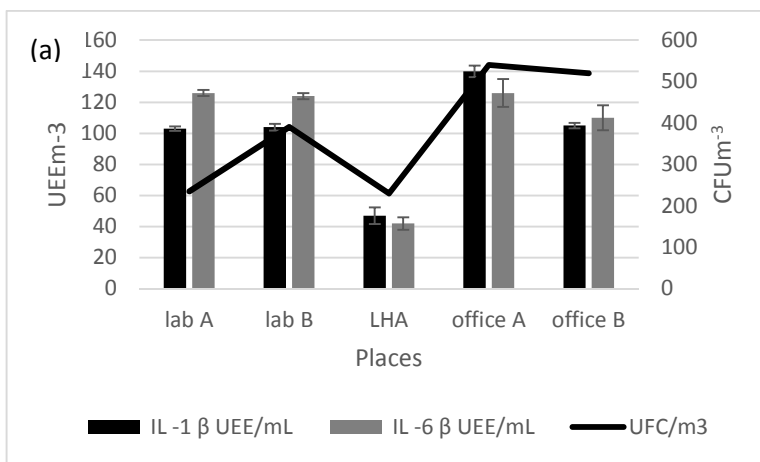
Places	Spring		Summer		Fall		Winter	
	IL -1 β EEUmL ⁻¹	IL -6 EEUmL ⁻¹	IL -1 β EEU/mL	IL -6 EEUmL ⁻¹	IL -1 β EEUmL ⁻¹	IL -6 EEUmL ⁻¹	IL -1 β EEUmL ⁻¹	IL -6 EEUmL ⁻¹
Outdoor	2,83 \pm 0,01	3.87 \pm 0,02	4,12 \pm 0,07	4,32 \pm 0,5	6,15 \pm 0,03	6,41 \pm 0,03	2,46 \pm 0,05	3,23 \pm 0,06
Lab A	1,03 \pm 0,02	1,26 \pm 0,02	2,2 \pm 0,22	2,2 \pm 0,2	2,16 \pm 0,09	2,49 \pm 0,07	0,55 \pm 0,01	1,10 \pm 0,01
Lab B	1,04 \pm 0,05	1,24 \pm 0,04	2,67 \pm 0,23	2,67 \pm 0,06	5,07 \pm 0,06	5,7 \pm 0,05	1,48 \pm 0,1	1,71 \pm 0,03
LAH	0,47 \pm 0,03	0,42 \pm 0,09	2,45 \pm 0,02	2,45 \pm 0,01	1,65 \pm 0,02	2,24 \pm 0,13	0,42 \pm 0,05	0,59 \pm 0,15
Office A	1, 40 \pm 0,01	1,26 \pm 0,07	2,57 \pm 0,11	2,57 \pm 0,02	2,4 \pm 0,01	2,08 \pm 1,38	1,34 \pm 0,12	1,70 \pm 0,05
Office B	1,05 \pm 0,01	1,1 \pm 0,08	2,46 \pm 0,1	2,46 \pm 0,04	5,17 \pm 0,02	4,68 \pm 0,04	1,71 \pm 0,01	1,71 \pm 0,06

It was found that outdoor pyrogenic activity ranged from 2,46 to 6,15 EEUmL⁻¹ for IL-1 β and from 3,23 to 6,41 EEUmL⁻¹ for IL- 6 in cold seasons and from 2,83 to 4,12mL⁻¹ for IL-1 β and from 3,87 to 4,32 EEU mL⁻¹ for IL- 6 in warm seasons. The indoor results ranged from 0,16 to 5,17 EEUmL⁻¹ for IL-1 β and from 0,49 to 5,7 EEUmL⁻¹ for IL-6 in cold seasons and from 1,03 to 2,67 EEUmL⁻¹ for IL-1 β and from 1,1 to 2,67 EEUmL⁻¹ for IL-6 in warm seasons. Higher values were recorded in fall following the same tendency of the fungi concentration. When we

considered the value 0,5 UE/mL as positive control, 70% of the samples remained over this limit, except the LAH and office A in the spring for IL-1 β and IL-6 and the LAH for IL-1 β in the winter.

When the results were evaluated separated by Laboratories (A,B and LAH) and Offices (A and B) we can be observed that for IL-1 β the results were balanced: spring 3,93 and 1,22 UEE mL⁻¹, summer 2,44 and 2,58 UEE mL⁻¹ fall 3,10 and 3,78 UEE mL⁻¹ and winter 2,81 and 1,32 UEE mL⁻¹ respectively for Labs and offices. For IL-6, the average of the office were higher than labs: spring 0,97 and 1,18 UEE mL⁻¹, summer 2,44 and 2,58 UEE mL⁻¹, fall 3,47 and 3,38 UEE mL⁻¹ and winter 0,81 and 1,70 UEE mL⁻¹ respectively for Labs and offices.

Another usual way of presenting the results is to be transformed in EUU m⁻³. Figure 2 summarize the inflammatory potential with IL-1 β and IL-6 UEE m⁻³ to correlate with the CFU counts. We can observed the same trend between the CFU m⁻³ and UEE m⁻³ and the highest signals for IL-6. However, despite this result, it is not possible to determine a good correlation between them. Our results ranged from 160 to 517 EUU m⁻³ for IL-1 β and from 490 to 570 EUU m⁻³ for IL-6 in cold seasons and from 103 to 267 EUU m⁻³ for IL-1 β and from 110 to 267 EUU m⁻³ for IL-6 in warm seasons. If the 150 UEE m⁻³ proposed to Bernasconi et al (2005) to be used as limit, more than 55% of the places investigated were over for IL-1 β and 65% for IL-6 thresholds.



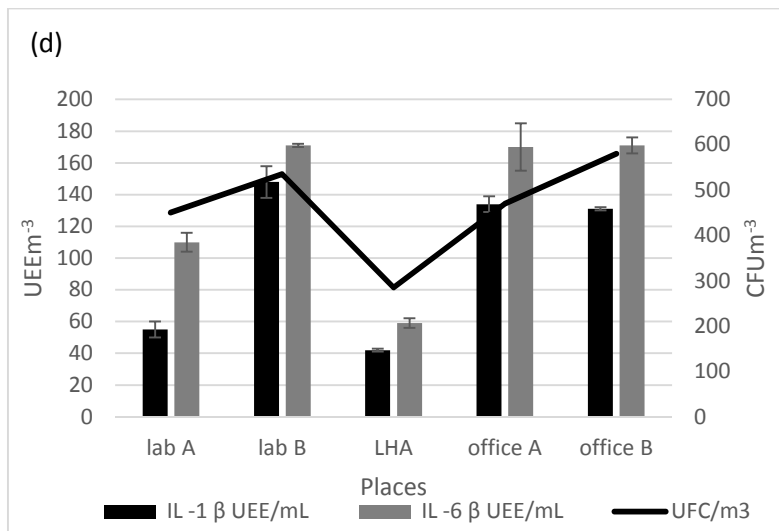
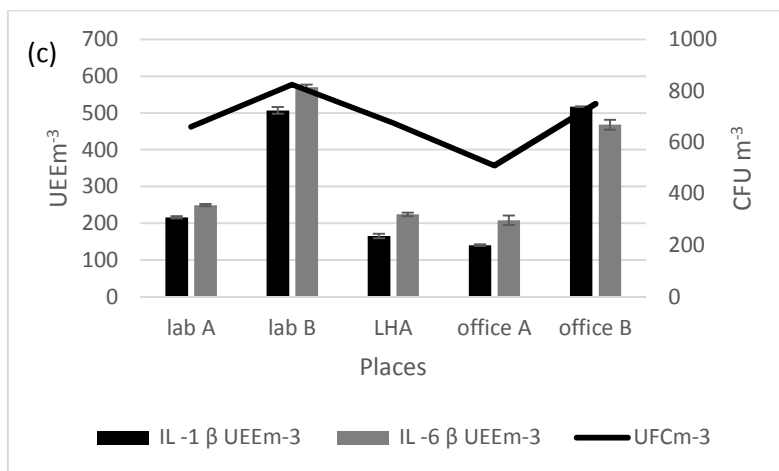
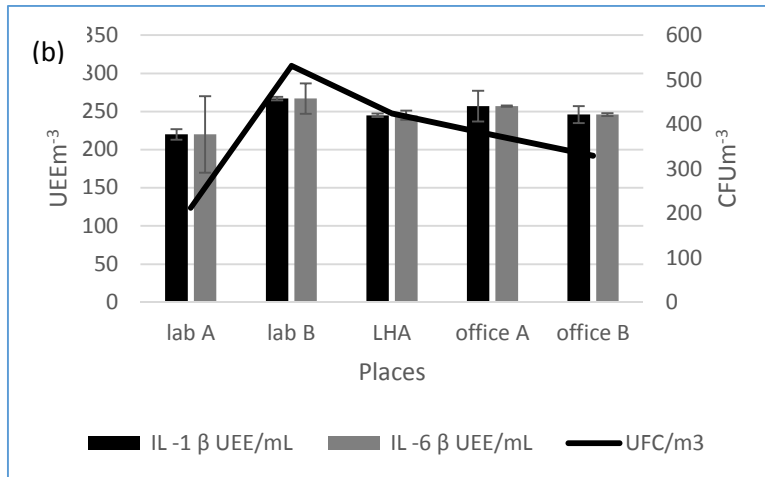


Figure 2. Air-sampling s. Air-sampling was carried out in air monitor cassettes in 3-fold values for each time point at different season (a) spring; (b) summer (c) fall (winter). Sampling volume was 1 l/min. Colony forming units were determined by counting colony growth after sampling air.

DISCUSSION

Sampling and analysis of air quality is therefore the first step to determine whether the environment poses a potential threat to exposed people, which was indispensable for health environmental. Microbial contamination threshold values and occupational exposure limit values in indoor environments have yet to be established, and the lack of standardized air sampling methods makes the comparison of existing data difficult to perform. Further studies are required to establish reference values for health places and more samples should be taken all the year round to ascribe this difference to seasonal variations.

Concerning moulds, 50% of the total of samples showed CFU m^{-3} values above recommended by the WHO and CEC (Threshold = 500 UFC m^{-3}) and 10% above recommended by the ANVISA (threshold = 750 UFC m^{-3}). For pyrogenic activity we 70% of the samples remained over the 0,5 EU mL^{-1} of the *E. coli*. The differences between the methodologies can be explained by the fact that the immune stimulatory potency is neglected in the CFU determinations. Moreover, the lack about acceptable limits for pyrogens in air samples, difficulty any comparison between methodologies. Previous studies used the same positive control for injectable products (0,5 EU mL^{-1}) for air samples, since the highly effective uptake of inhaled substances by the 100 m^2 of mucous membrane in the lung results in effects similar to injection of these substances (Kindinger et al, 2005).

Generally, outdoor air is the dominant source of indoor fungi. The fungal spores enter through the air conditioning system, through doors and windows and by means of contaminated materials and contents. The HR also is an important factor can be related with high-count fungi and our results showed in all of samples HR higher than recommended for the ASHRED. It should be stressed that I/O ratio remained stable and lower the 1,5 showed the fungi contamination remain within the acceptable limits when considered the relation outdoor indoor. In all the health places under investigation, all samples were depended on sampled environment, whereas fungi load and the pyrogenic activity of the air were lower indoor than outdoors, representing 21-53% of the outdoor concentration and 14-89% respectively. Also, in a general way, the average of fungi contamination and pyrogenic activity of the IL-6 were higher in the offices than labs. IL-1 β showed balanced results between offices and labs.

When comparing microbiological results and data on the pyrogenic activity of air samples, EEU m^{-3} and CFU m^{-3} values, mainly showed a similar trend. The results ranged from

103 to 517 EUU m^{-3} for IL-1 β and from 110 to 570 EUU m^{-3} for IL-6. However, no data from comparable measuring sites are available, as the MAT has so far been applied to investigate bioaerosol activity in duck-fattening units ($7,5 \times 10^3$ to $3,8 \times 10^5$ EEU m^{-3}) and in calf stables ($0,1$ to 16×10^6 EEU m^{-3}) and offices (Kindinger et al. 2005; Zucker et al. 2006, Bernasconi et al, 2010). For the offices evaluates by Bernasconi et al (2005) 95% of them, the pyrogen content did not exceed 150 EEU m^{-3} and was 102–104 fold lower than the places of farm (Bernasconi et al, 2005). Comparatively, our results are closer to offices than contaminated places.

Used of the MAT for IAQ is very important, since provided response to the main biological contaminants in indoor air. Their own internal mechanism of action support their used. Whereas, during respiration, airways are in permanent contact with pyrogens fever-inducing substances. Therefore, macrophages and blood monocytes expressing CD14 may be activated and a signal transduction cascade initializes leading to the release of a variety of inflammatory mediators, particularly IL-1 β , TNF- α and IL-6. Although it is, clear that exposure to pyrogens can cause acute and chronic symptomatology like headache, fatigue, eye or throat irritation and wheezing, their effects on human health are under enquiry. Some studies have been conducted to investigate the association between microbial growth or pyrogens and possible health outcomes at working places, however is very difficult to compare these results and define threshold values because none of the methods for measuring exposure and health outcomes has been standardized.

Despite the difficulties discuss before, MAT has the advantage that response to pyrogenic contaminants and thus mimics the human immunological response. Although it does not allow any conclusion on the type of contaminant present in the sample, it reflects the way human body could react to the contaminant and may inform on the inflammatory potential of bioaerosol in humans.

CONCLUSIONS

Use a standardized MAT could as a rapid, reliable tool to describe human exposure to bioaerosol in Health place. The results of this study are the first must be followed in laboratories and indicated that MAT can be used as complementary evaluation for fungi counts for Health Units. However, it is important to stressed the necessity of the more extensive studies covering all seasons are needed to propose EEU threshold values for IAQ in Health Places.

References

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 09, de 16 de Janeiro de 2003. Orientação Técnica sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. Revisão e atualização da RE/Anvisa n° 176, de 24 de outubro de 2000. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, DF, 20 Jan 2003.

BERNASCONI, C.; et al. Pyrogenic activity of air to characterize bioaerosol exposure in public buildings: a pilot study. *Letters in applied microbiology*, v.50, n.6, p. 571 – 577, 2010.

Burge HA, Pierson DL, Groves TO, Strawn, KF, Mishra SK. Dynamics of airborne fungal populations in a large office building. *Curr Microbiol* 2000;40(1):10-6.

Caldeira, C.; Presgrave, OAF; Moraes, AML e Delgado, IF (2012). Microbiological evaluation of indoor air quality: legal and methodological aspects *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v. 10, n. 1, p. 51-60

CEC. Commission of the European Communities (1994). *Biological Particles in Indoor Environments*. Luxembourg, Sweden: Commission of the European Communities; Report 12.

Graudenz GS, Oliveira CH, Tribens A, Mendes Jr C, Latorre MRDO, Kalil J. Association of air-conditioning with respiratory symptoms in office workers in tropical climate. *Indoor Air* 2005;15(1):62-6.

Hartung T, Wendel A 1996. Detection of pyrogens using human whole blood. *In Vitro Toxicol.*; 9(4):353-359.

Lieber, S.V. et al. Standardization of whole blood assay for determination of pyrogenic activity inorganic dust samples. *International Journal of Hygiene Environmental Health* v.212, p.547–556, 2009.

Menezes EA, Trindade ECP, Costa MM, Freire CCF, Cavalcante MS, Cunha FA. Airborne fungi isolated from Fortaleza city, State of Ceará, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2004;46(3):133-7.

Ortiz, G. et al. A Study of air microbe levels in different areas of an hospital. *Current Microbiology*, New York, n. 59, n. 1, p. 53-58, jul. 2009. doi: 10.1007/s00284-009-9398-7

Pasanen A.L., Kalliokioski O., Pasanen P., Jantunen M.J., Nevalainen A. (1991). Laboratory studies on the relationship between fungal growth and atmospheric temperature and humidity. *Environment International*, 17, 225- 228.

PASQUARELLA, C; PITZURRA, O.; SAVINO A. The Index of Microbial Air Contamination. *Journal of Hospital Infection* v. 46, p.241-256, 2000.

Ponce-Caballero, C., Cerón-Palma, I.; López-Pacheco, Gamboa-Marrufo, Quintal-Franco (2010). Indoor-outdoor fungal-aerosols ratios of domestic homes in Merida, Mexico. *Ingeniería* 14 (3), 169-175.
<http://www.revista.ingenieria.uady.mx/volumen14/indoor.pdf>

Schindler, S. et al. Development, validation and applications of the Monocyte Activation Test for pyrogens based on human whole blood. *ALTEX*, Germany, v. 26, n.4, p. 265-277, oct./dec. 2009.

Schindler, S. et al. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. *Journal of Immunological. Methods*, Amsterdam, v. 316,n. 1-2, p. 42-51, oct. 2006. doi:10.1016/j.jim.2006.07.023

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Indoor air quality: biological contaminants. European Series, n. 31, Copenhagen, Denmark, 1988. Zucker, B.A., Scharf, P. and Kersten, C. (2006) Determination

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programmes and projects: Guidelines for indoor air quality: dampness and mould, 2009. Disponível em: <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0017/43325/E92645.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2015.

Zihe, EM; Fernandes RB; Macedo, MRV, Vieira VM; Moraes, AML (2014). Determination of air fungal contamination in public kindergartens in Rio de Janeiro/ RJ. *Vigilância Sanitária em Debate*; 2(1):51-56.

Zucker, B.A., Scharf, P. and Kersten, C. (2006) Determination of the inflammatory potential of bioaerosols from a duckfattening unit by using a *limulus ameocyte lysate* assay and human whole blood cytokine response. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53, 176–180.