

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

Sheila Regina Gomes Albertino

**AVALIAÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DE
AMOSTRAS DE ÁGUA TRATADA PARA HEMODIÁLISE NO
LABORATÓRIO E SUA INTERFERÊNCIA NA CONCENTRAÇÃO DE
ENDOTOXINA BACTERIANA**

Rio de Janeiro

2012

Sheila Regina Gomes Albertino

**AVALIAÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DE
AMOSTRAS DE ÁGUA TRATADA PARA HEMODIÁLISE NO
LABORATÓRIO E SUA INTERFERÊNCIA NA CONCENTRAÇÃO DE
ENDOTOXINA BACTERIANA**

Dissertação 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

Orientadora: Helena Pereira da Silva Zamith

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Albertino, Sheila Regina Gomes

Avaliação do tempo e temperatura de armazenamento de amostras de água tratada para hemodiálise no laboratório e sua interferência na concentração de endotoxina bacteriana / Sheila Regina Gomes Albertino– Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

83 f.: il.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2012.

Orientadora: Helena Pereira da Silva Zamith

1. Polissacarídeos Bacterianos. 2. Haemophilus influenzae tipo b . 3. Vacinas Anti-Haemophilus. 4. Espectrofotometria. 5. Avaliação. 6. Métodos Analíticos de Preparação de Amostras. 7. Controle de Qualidade I. Título

Evaluation of storage time of treated water samples for hemodialysis in the laboratory and its interference in the concentration of bacterial endotoxin.

Sheila Regina Gomes Albertino

**AVALIAÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DE
AMOSTRAS DE ÁGUA TRATADA PARA HEMODIÁLISE NO
LABORATÓRIO E SUA INTERFERÊNCIA NA CONCENTRAÇÃO DE
ENDOTOXINA BACTERIANA**

Dissertação 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 27/07/2012.

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutora)
Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde

Lenise Arneiro Teixeira (Doutora)
Universidade Federal Fluminense

Antônio Eugênio Cardoso Almeida (Doutor)
Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho:

À DEUS,

**À meus pais, Altino (*in memoriam*) e
Lourdes.**

Ao meu marido e companheiro Fernando.

À minha família e amigos.

Avance Sempre

Na vida as coisas, às vezes, andam muito devagar. Mas é importante não parar. Mesmo um pequeno avanço na direção certa já é um progresso, e qualquer um pode fazer um pequeno progresso.

Se você não conseguir fazer uma coisa grandiosa hoje, faça alguma coisa pequena.

Pequenos riachos acabam convertendo-se em grandes rios.

Continue andando e fazendo.

O que parecia fora de alcance esta manhã vai parecer um pouco mais próximo amanhã ao anoitecer se você continuar movendo-se para frente.

A cada momento intenso e apaixonado que você dedica a seu objetivo, um pouquinho mais você se aproxima dele.

Se você pára completamente é muito mais difícil começar tudo de novo.

Então continue andando e fazendo. Não desperdice a base que você já construiu. Existe alguma coisa que você pode fazer agora mesmo, hoje, neste exato instante.

Pode não ser muito mas vai mantê-lo no jogo.

Vá rápido quando puder. Vá devagar quando for obrigado.

Mas, seja, lá o que for, continue. O importante é não parar!!!

AGRADECIMENTOS

- Ao INCQS pela realização deste estudo.
- A todos os amigos do INCQS que contribuíram para a realização desse trabalho.
- À Dra. Helena Pereira da Silva Zamith, Chefe do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, INCQS, FIOCRUZ, por me orientar neste estudo, pela sua paciência, dedicação ao trabalho e pelo seu grande profissionalismo.
- Ao chefe do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, INCQS, FIOCRUZ, Fernando Faria Fíngola, por todo companheirismo, incentivo, cooperação para conclusão desse trabalho e por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.
- A Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes, por ser minha revisora e pela inestimável ajuda e companheirismo na conclusão deste trabalho.
- Ao amigo de laboratório Nelson Pedreira, por toda ajuda nos seguimentos desta realização.
- A DEUS, por me permitir mais uma vitória.

RESUMO

A terapia renal substitutiva ou hemodiálise tem por finalidade promover a retirada das substâncias tóxicas, água e sais minerais do organismo de pacientes com insuficiência renal crônica. A Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC) nº 154/2006 estabeleceu o regulamento técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise, o qual preconiza uma concentração limite de endotoxina ≤ 2 EU/m na água empregada em procedimentos de hemodiálise. Este trabalho propôs avaliar, através da análise de endotoxina bacteriana em água para hemodiálise, como o período compreendido desde a sua coleta, armazenagem, transporte e entrada no laboratório até a efetiva realização das análises poderiam alterar os resultados do teste do Lisado de Amebócitos de *Limulus* (LAL) pelo método de gelificação, já que essas condições não estão claramente estabelecidas no regulamento. As amostras foram avaliadas no período de 24 horas, 7 e 14 dias sob refrigeração ($5,9 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e em temperatura ambiente ($22,6 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$). Foram analisadas 13 amostras para cada ponto de coleta em clínicas de hemodiálise (Pós-osmose e Reuso), totalizando 26 amostras pertencentes a um universo de 59 amostras que entraram para análise no primeiro semestre de 2012 no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da FIOCRUZ. O estudo demonstrou que as amostras mantidas sob refrigeração, em ambos os pontos, apresentaram resultados satisfatórios em todos os períodos de análise, 24 horas, 7 e 14 dias, com concentrações de endotoxina $< 1,25$ EU/mL, permitindo que o teste seja realizado até 14 dias. As amostras mantidas à temperatura ambiente para ambos os pontos de coleta somente se mantiveram satisfatórias, após análise, no período de 24 horas, com concentrações de endotoxina $< 1,25$ EU/mL. As amostras mantidas em temperatura ambiente e analisadas nos períodos de 7 e 14 dias, em ambos os pontos, apresentaram em sua maioria resultados insatisfatórios com concentrações de endotoxina variando desde $< 0,125$ EU/mL até concentrações > 100 EU/mL. Portanto, o teste deverá ser realizado no prazo máximo de 1 dia. O estudo demonstrou também que das 59 amostras analisadas em 2012, 91,5% apresentaram uma concentração de endotoxina ≤ 1 EU/mL. Com base nesses resultados, sugere-se que a RDC nº 154/2006 reduza a concentração de endotoxina máxima

permitida em água de ≤ 2 EU/mL para ≤ 1 EU/mL, já preconizada pela 35ª ed. da Farmacopeia Americana.

Palavras – chave: Endotoxina. Teste de LAL. Água para hemodiálise.

ABSTRACT

The renal replacement therapy or hemodialysis aims to promote the removal of toxic substances, water and minerals from the body of patients with chronic renal failure. The Board of Directors' Resolution of the Brazilian Agency of Sanitary Surveillance (RDC) no. 154/2006 regulates the technical standards for the operation of Dialysis Services, recommending a concentration limit of endotoxin ≤ 2 EU / mL in the water used in hemodialysis procedures. This work proposes to investigate, through the analysis of endotoxin, how the period ranging from the water collection, storage, transport and entry into the laboratory to the effective performance of the analysis can alter the results of the *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) test, gel clot method, since the regulation does not clearly establish those conditions. The samples were evaluated within 24 hours, 7 and 14 days under refrigeration ($5.9\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) and at room temperature ($22.6\pm 0.7^{\circ}\text{C}$). Thirteen samples at each collection point were analyzed (post-osmosis and Reuse): a total of 26 samples belonging to a universe of 59 input samples for analysis in the first half of 2012 at Fiocruz National Institute for Quality Control in Health. The study showed that the samples stored under refrigeration, at both points, showed satisfactory results in all study periods - 24 hours, 7 and 14 days - with concentrations of endotoxin < 1.25 EU / mL, allowing the test to be performed up to 14 days. The samples kept at room temperature at both collection points only remained satisfactory after analysis within 24 hours, with concentrations of endotoxin < 1.25 EU / mL. The samples kept at room temperature and analyzed within 7 and 14 days, at both sites, presented mostly unsatisfactory results with endotoxin concentrations ranging from < 0.125 EU / ml to concentrations > 100 EU/ml. Thus, the test should be performed in the maximum period of one day. The study also showed that out of the 59 samples analyzed in 2012, 91.5% had an endotoxin concentration of ≤ 1 EU / mL. Based on these results, it is suggested that RDC no. 154/2006 reduce the concentration of endotoxin of ≤ 2 EU/mL to ≤ 1 EU / mL, as recommended by the 35th ed. of The United States Pharmacopoeia.

Key-words: Endotoxin. LAL test. Hemodialysis water

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAMI	Association for the Advancement of Medical Instrumentation
AG	Ácidos graxos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLE	Concentração limite de endotoxina
CPHD	Concentrado polieletrólítico para uso em hemodiálise
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EU	Unidades de endotoxina
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Gel-Clot	Gelificação
GM	Gabinete Ministerial
(H ⁺)	Hidrogênio
IDR	Instituto de Doenças Renais
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IRC	Insuficiência renal crônica
ISO	International Organization for Standardization
KDO	Ácido 2-ceto-3-desoxioctanóico
L	Litro
LAL	Lisado do amebócito do <i>limulus</i>
LACENS	Laboratórios Centrais
LPS	Lipopolissacarídeo
MDV	Máxima diluição válida
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mol	Molaridade
NAG	N-acetilglicosamina
NBR	Norma Brasileira
(OH)	Hidroxila
pH	Potencial de hidrogênio

POP	Procedimento Operacional Padronizado
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
TR	Terapia renal
TRS	Terapia renal substitutiva
UFC	Unidade formadora de colônia
USP	The United States Pharmacopeia
URTS	Unidade de terapia renal substitutiva

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais espécies bacterianas encontradas na água para hemodiálise	28
Quadro 2. Padrão de qualidade da água tratada utilizada na preparação de solução para diálise.....	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática de uma sessão de hemodiálise	23
FIGURA 2. Coloração Gram para identificação da parede celular de bactérias	26
FIGURA 3. Parede celular de bactérias Gram-negativas	26
FIGURA 4. Parede celular de bactérias Gram-positivas	27
FIGURA 5. Esquema da parede celular de bactéria Gram-negativa	31
FIGURA 6. Sistema de purificação da água para hemodiálise: pré-tratamento e osmose reversa	34
FIGURA 7. Esquema dos processos físicos de osmose e osmose reversa	36
FIGURA 8. Tratamento da água por osmose reversa em clínicas de hemodiálise	37
FIGURA 9. Processo de extração do sangue do <i>Limulus Polyphemus</i>	41
FIGURA 10. Esquema do processo da formação do gel	42
FIGURA 11. Ponto de coleta contíguo à máquina de hemodiálise - Pós-Osmose	48
FIGURA 12. Ponto de coleta de água em procedimento de hemodiálise - Sala de reuso	49
FIGURA 13. Resultados dos ensaios do LAL em amostras de água coletadas no ponto de pós-osmose 1,7 e 14 dias após manutenção em geladeira à temperatura de $(5,9\pm 0,5^{\circ}\text{C})$	55
FIGURA 14. Resultados dos ensaios do LAL em amostras de água coletadas no ponto de pós-osmose 1,7 e 14 dias após manutenção à temperatura ambiente $(22,6\pm 0,7^{\circ}\text{C})$	55
FIGURA 15. Resultados dos ensaios do LAL em amostras de água coletadas no ponto de Reuso 1,7 e 14 dias após manutenção em geladeira à temperatura de $(5,9\pm 0,5^{\circ}\text{C})$	59
FIGURA 16. Resultados dos ensaios do LAL em amostras de água coletadas no ponto de Reuso 1,7 e 14 dias após manutenção à temperatura ambiente $(22,6\pm 0,7^{\circ}\text{C})$	59
FIGURA 17. Amostras analisadas de Água para Hemodiálise de Janeiro a Dezembro de 2011 (165 amostras) pelo método de gelificação do teste do LAL	61
FIGURA 18. Amostras analisadas de Água para Hemodiálise de Janeiro a Junho de 2012 (59 amostras) pelo método de gelificação do teste do LAL	62
FIGURA 19. Amostras analisadas de Água para Hemodiálise de Janeiro a Junho de 2012 (59 amostras) por faixa de concentração de endotoxina através do teste do LAL –método de gelificação.	63

FIGURA 20. Percentual de amostras de água para hemodiálise analisadas em 2012 com resultados variando entre < 1 EU/mL e > 1 EU/mL	64
FIGURA 21. Amostras analisadas em Água para Hemodiálise/2012 (59 amostras) por faixa de concentração.	65
FIGURA 22. Percentual de amostras analisadas em 2012 com resultados variando entre < 1 EU/mL e > 1 EU/mL.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Amostras analisadas no ponto de Pós-osmose, mantidas em geladeira e temperatura ambiente56

Tabela 2- Amostras analisadas no ponto de Reuso, mantidas em geladeira e temperatura ambiente..... 60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA (TRS) OU HEMODIÁLISE	18
1.1.1. Expectativa de vida.....	18
1.1.2. Histórico da TRS	19
1.2. ÁGUA PARA HEMODIÁLISE.....	21
1.3. CONTAMINANTES DA ÁGUA.....	23
1.3.1. Contaminantes minerais.....	23
1.3.2. Contaminantes orgânicos.....	25
1.3.3. Contaminantes microbiológicos.....	25
1.4. ENDOTOXINAS.....	30
1.4.1. Natureza química da endotoxina.....	30
1.4.2. Composição química das regiões do LPS.....	31
1.4.3. Lipídeo A e virulência.....	32
1.5. SISTEMAS DE TRATAMENTO DA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE.....	33
1.5.1. Pré-tratamento da água potável.....	33
1.5.2. Métodos de tratamento de água para hemodiálise: deionização e osmose reversa	34
1.6. PARÂMETROS DE QUALIDADE PARA ÁGUA DE HEMODIÁLISE....	37
1.7. TESTE <i>IN VITRO</i> DO LISADO DE AMEBÓCITOS DO <i>LIMULUS</i> (LAL).....	40
1.7.1. Desenvolvimento do teste do LAL	40
1.7.2. Fundamentos do teste do LAL.....	40
1.8. O PAPEL DO INCQS NO CONTROLE DE QUALIDADE DA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE	43
2. JUSTIFICATIVA	44
3. OBJETIVOS	45
3.1. OBJETIVO GERAL	45
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4. METODOLOGIA	46
4.1. PROCEDIMENTO DE COLETA DAS AMOSTRAS	46

4.2. ACONDICIONAMENTO DE AMOSTRAS DE ÁGUA PARA HEMODIÁLISE.....	47
4.3. AMOSTRAGEM, PONTOS DE COLETA E PERIODICIDADE DAS ANÁLISES.....	47
4.4. MATERIAL E INSUMOS PARA O TESTE DO LAL - MÉTODO DE GELIFICAÇÃO	49
4.5. CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO LIMITE DE ENDOTOXINA (CLE) NO ENSAIO DO LAL	51
4.6. CÁLCULO DA MÁXIMA DILUIÇÃO VÁLIDA (MDV) NO ENSAIO DO LAL.....	52
4.7. EXECUÇÃO DO ENSAIO.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS.....	68

1.INTRODUÇÃO

1.1. TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA (TRS) OU HEMODIÁLISE

A hemodiálise ou a TRS promove a retirada das substâncias tóxicas, água e sais minerais do organismo (ALIANDRO; PASCUET, 2005). Em geral, é realizada 3 vezes por semana, em sessões com duração média de 3 a 4 horas, com auxílio de uma máquina dentro das clínicas especializadas neste tratamento. Para que o sangue passe pela máquina, é necessária a colocação de um cateter ou fístula, que é um procedimento realizado mais comumente nas veias do braço, para permitir que elas fiquem com maior diâmetro, e desta forma, forneçam o fluxo de sangue adequado para ser filtrado (COIMBRA *et al.*, 2007). É um tratamento primordial para pacientes com insuficiência renal crônica (IRC). A situação torna-se crucial, em razão das dificuldades na obtenção de um transplante renal, pois um paciente pode atualmente ter que esperar alguns anos para obtê-lo e durante este tempo, a qualidade do tratamento de hemodiálise a ele prestado será fator preponderante para a qualidade e sobrevida do paciente (FAVERO *et al.*, 1992; HOENICH; RONC; LEVIN, 2006).

1.1.1. Expectativa de vida

O aumento da expectativa de vida implica em maiores gastos com a saúde, não só porque o indivíduo vive mais tempo e, em função disto, utiliza os serviços durante mais tempo, bem como pelas demandas por assistência que se tornam mais complexas requerendo tecnologias e procedimentos de custos elevados. A hemodiálise, que vem gradativamente ampliando o seu espaço enquanto uma modalidade terapêutica para pacientes com problemas renais crônicos, constitui-se um procedimento de alto custo que envolve uma assistência altamente especializada, tecnologia avançada, ações de alta complexidade, e requer uma articulação entre os níveis secundários e terciário de assistência (CHAVES *et al*, 2002).

CHAVES e colaboradores (2002) realizaram um estudo em relação à sobrevida de pacientes submetidos à hemodiálise, de 1997 a 2000. A partir das probabilidades de sobrevivência, estimaram também os gastos por pacientes

que iniciaram o tratamento, concluindo que cerca de 60% dos pacientes pesquisados sobreviveram ao final dos quatro anos de estudo, apontando para uma sobrevivência elevada. Os resultados mostraram ainda que o crescimento dos gastos com hemodiálise deve-se ao aumento da sobrevida dos pacientes e não especificamente a uma ampliação da demanda pela terapia.

No Japão, a Sociedade Japonesa de Terapia para Diálise estabeleceu padrões de qualidade da água para hemodiálise mais restritos que os estabelecidos internacionalmente. Naquele país são utilizados dialisadores de alta *performance* (ou em português:desempenho) e é recomendada a utilização de fluido de diálise ultrapuro em todas as modalidades de diálise (KAWANISHI *et al.*, 2009). MASAKANE e colaboradores (2008) avaliaram a qualidade microbiológica do fluido para hemodiálise em várias clínicas no Japão e verificaram, que a qualidade deste é extremamente alta e, associaram este fato a uma alta taxa de sobrevida de pacientes, que realizam hemodiálise. Evidentemente, estas medidas adotadas em países desenvolvidos, exemplificam a importância de se manter a qualidade microbiológica da água para hemodiálise. O trabalho realizado por FERREIRA (2006) junto ao Programa de Hemodiálise do INCQS mostrou também a importância do monitoramento constante das Unidades de Terapia Renal Substitutiva (UTRS) e da avaliação microbiológica da água utilizada.

NYSTRAND (2009) alerta para necessidade de padronização das recomendações oficiais para a qualidade dos fluidos de diálise, visando a harmonização e uma referência mundial de qualidade, que facilitará a interpretação de estudos internacionais e, conseqüentemente a garantia da sobrevida de pacientes com doenças renais crônicas.

1.1.2. Histórico da TRS

A TRS teve seu início em 1941, na Holanda ocupada pelas tropas da Alemanha nazista. O médico holandês naturalizado norte-americano Dr. Willem Johan Kolff idealizou uma máquina de hemodiálise (rim artificial) que utilizava cerca de quarenta metros de tubos de membrana de acetato de celulose enrolada em um tambor rotatório, o qual mantinha-se mergulhado em uma bacia contendo a solução de diálise. Uma bureta coletava o sangue do

paciente (não havia bomba de sangue), e pela ação da gravidade o impulsionava através da membrana dialisadora. O sangue, depois de purificado, retornava ao corpo do paciente. A história registra 15 pacientes tratados pelo “rim artificial” antes que um deles sobrevivesse. A primeira sobrevivente foi Sophia Schafstadt, atendida em setembro de 1945, em coma. Após a hemodiálise, a paciente recuperou a consciência e viveu por mais 7 anos (TUOTO, 2009).

No Brasil, a hemodiálise teve início em 1949, quando o Dr. Tito Ribeiro de Almeida, do Hospital de Clínicas da USP, dialisou um paciente com IRC, iniciando-se, a partir desse trabalho, o desenvolvimento dessa técnica no país (ABREU, 2005). Segundo o censo de 2011 da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), existem 687 clínicas cadastradas, sendo 643 em atividade com o programa de tratamento crônico, atendendo 50.128 pacientes com IRC em diálise no país. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2011)

O acidente ocorrido no Instituto de Doenças Renais (IDR) em Caruaru, Pernambuco, durante o mês de fevereiro de 1996, transformou a história e a prática clínica da hemodiálise no Brasil. A contaminação da água utilizada para hemodiálise com microcistina, uma toxina de cianobactéria, causou a morte de 65 pacientes e trouxe vários ensinamentos à comunidade médica e à sociedade civil. O IDR funcionava há 10 anos mantendo cerca de 130 pacientes sob tratamento dialítico. A cidade de Caruaru, com 217.430 habitantes, situada a 135 km de Recife (região do clima semi-árido brasileiro) apresenta temperatura entre 20 a 38°C ao longo do ano. A escassez e o fornecimento irregular de água na cidade levou a utilização de água transportada por caminhão pipa (sem tratamento adequado) contaminada com toxina de cianobactéria. Como consequência, a maioria dos pacientes apresentou toxemia. Posteriormente, cerca de 50% evoluiu com coagulopatia, acometimento do sistema nervoso central e insuficiência hepática seguida por óbito (COELHO, 1998).

A partir desse fato e baseando-se em padrões dos centros mais desenvolvidos, o Ministério da Saúde, através da Portaria do Gabinete Ministerial (MS/GM) nº 2042 de 11/10/1996, estabeleceu parâmetros mais claros e definidos para o funcionamento dos Serviços de TRS. Esta Portaria foi substituída em 03 de janeiro de 2000 pela Portaria MS/GM nº 82.

No Brasil, atualmente, existem duas normas que estabelecem parâmetros da qualidade de água para hemodiálise. A primeira é a Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA (RDC) nº 154 de 15/06/2004, republicada em 2006, que estabelece o “Regulamento Técnico para o Funcionamento dos Serviços de Diálise”, e que tem como base as sugestões da *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI), onde são definidos os parâmetros para a produção de água tratada para o uso em hemodiálise. A segunda norma é a RDC nº 08 de 02/01/2001 que institui as “Boas Práticas de Fabricação de Concentrados Polieletrólíticos para Hemodiálise”, baseada nos limites preconizados pela Farmacopéia Européia (2011), onde são definidos entre outros procedimentos, os parâmetros de qualidade da água tratada para produção de concentrados para hemodiálise (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2007).

1.2. ÁGUA PARA HEMODIÁLISE

Até a década de 70, acreditava-se que a água potável pudesse também ser utilizada em hemodiálise. Com o aumento do número de pacientes em tratamento dialítico e de sua sobrevida, acumularam-se evidências que permitiam correlacionar os contaminantes da água com os efeitos adversos causados pelo procedimento (SILVA *et al.*, 1996).

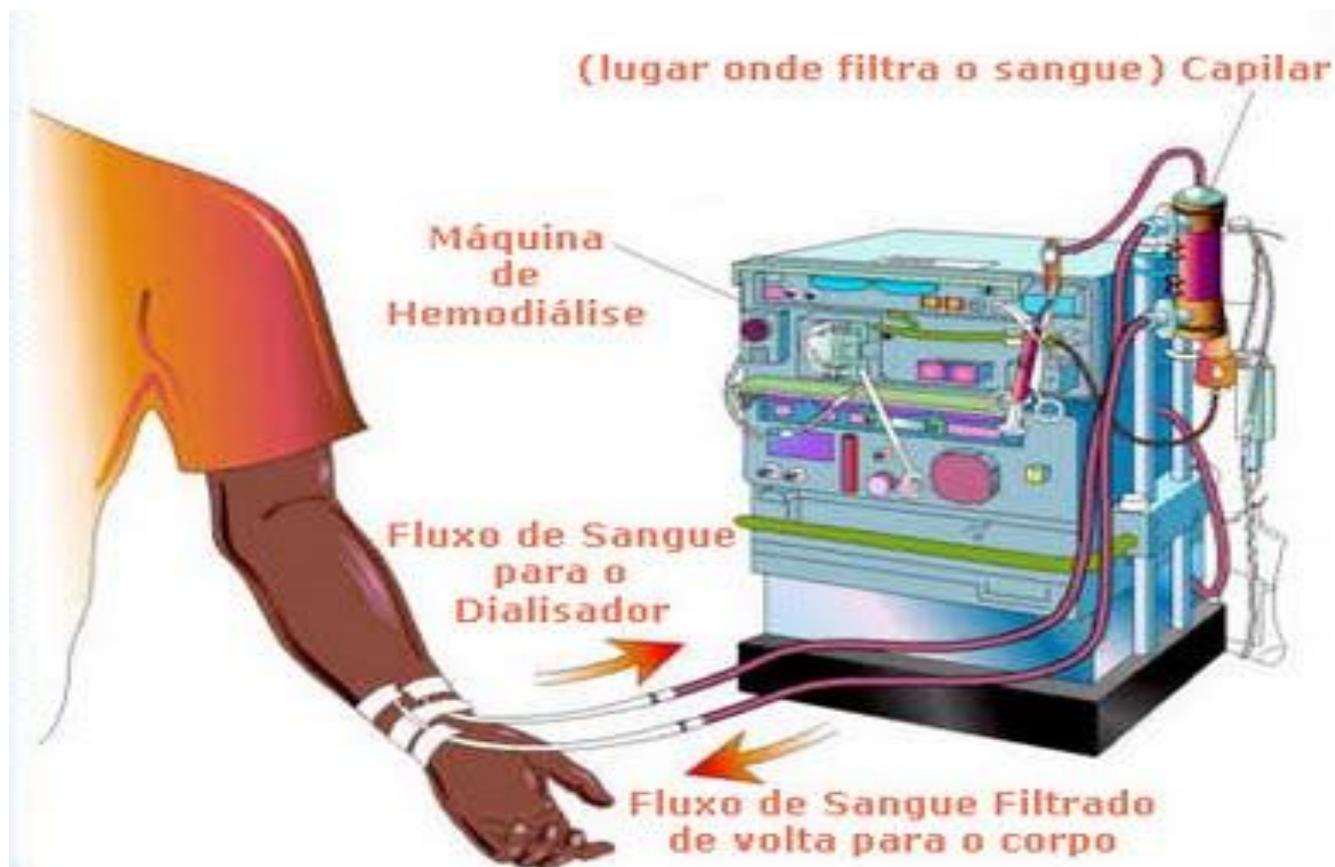
Pacientes em tratamento por hemodiálise são expostos a volumes de água que variam entre 18.000 a 36.000 litros por ano. Portanto, se a água não for corretamente tratada, vários contaminantes químicos, bacteriológicos e tóxicos, poderão ser transferidos para os pacientes, levando ao aparecimento de efeitos adversos, às vezes letais (SILVA *et al.*, 1996).

Um dos primeiros eventos adversos relacionados à qualidade da água foi a chamada “síndrome da água dura”, que se caracterizava pelo aparecimento - durante as sessões de diálise - de náuseas, vômitos, letargia, fraqueza muscular intensa e hipertensão arterial. Tal quadro estava diretamente associado à presença de grandes quantidades de cálcio e magnésio na água não tratada. A remoção desses elementos por equipamentos denominados abrandadores era seguido pelo desaparecimento dos sintomas e sinais descritos acima (SILVA *et al.*, 1996).

Apesar da água de abastecimento público que chega ao hospital ou unidade de saúde ser potável para consumo humano, ela é inadequada para uso em hemodiálise ou para outros fins especiais (hemodinâmica, lavagem de cateteres, preparação de dietas enterais, etc), uma vez que a água potável contém cloro e, dependendo da origem da água ou da rota percorrida nas tubulações externas, pode conter também material orgânico, sais minerais, metais pesados, micro-organismos, endotoxinas ou microcistinas produzidas por cianobactérias, devendo esta água passar por novo tratamento antes de sua utilização (PEGORARO, 2005).

Nas sessões de hemodiálise (Figura 1), a água tratada é utilizada para diluir soluções concentradas de sais. As soluções, conhecidas como concentrados polieletrólíticos para uso em hemodiálise (CPHD), depois de diluídas pelo equipamento de diálise compõem a solução dialítica. Esta solução é utilizada na filtração sanguínea de produtos metabólicos produzidos pelo paciente renal crônico. O sangue do paciente é bombeado através de membranas semipermeáveis, denominadas capilares ou dialisadores, imersos na solução de diálise, onde ocorre a filtração das substâncias indesejáveis do sangue, com substituição pelos íons na solução de cálcio, magnésio, sódio e potássio (RAMIRES, 2008). Os dialisadores e as linhas arteriais venosas podem ser utilizadas, para o mesmo paciente, até 12 (doze) vezes, quando utilizado o reprocessamento manual, ou até 20 (vinte) vezes, quando utilizado reprocessamento automático, requisitos exigidos em máquinas registradas pela ANVISA. Esse procedimento denomina-se **reuso** (Brasil, 2006).

Figura 1. Representação esquemática de uma sessão de hemodiálise



Fonte: < <http://www.nefro.com.br/imagens/desenho> > [Acesso em 22 de outubro de 2011].

1.3. CONTAMINANTES DA ÁGUA

1.3.1. Contaminantes minerais

Segundo SILVA *et. al*, (1996) os contaminantes minerais mais encontrados nas águas de superfície são:

- Flúor- a presença de flúor em concentrações iguais ou superiores às do alumínio pode levar à formação de complexo de flúor, que em presença de sódio formaria o mineral conhecido como criolita, difícil de ser retirado

do sistema de tratamento. A sobrecarga crônica por fluoretos ocasiona quadros de osteomalacia;

- Cloro- o cloro livre e seus derivados (dióxido, hipocloritos, cloramina) são adicionados às águas naturais para eliminar micro-organismos e/ou oxidar certos íons indesejáveis, como íons de ferro e manganês. A cloramina, resultante da combinação de cloro e amônia, quando presente em concentrações elevadas, leva à metahemoglobinemia, hemólise e anemia severa;
- Cobre- o cobre pode provir de tratamento para algas ou da corrosão das canalizações. Pode causar hemólise severa e lesões hepáticas;
- Prata- provém de dejetos da fabricação de objetos, jóias e radiografias. A intoxicação crônica leva a argirose cutânea, que se caracteriza por pele acinzentada e formação de linha acinzentada gengival;
- Arsênico- se origina de detergentes à base de fosfatos, produtos sanitários, pigmentos e corantes. Pode ocasionar problemas digestivos, neurológicos e cutâneos (melanomas). Altera o DNA no processo de divisão celular resultando em efeito cancerígeno;
- Cádmio- a partir de produtos de revestimentos metálicos, pinturas e materiais plásticos, é um elemento extremamente tóxico, com efeito carcinogênico, lesa túbulos renais, provoca doença óssea e hipertensão arterial;
- Zinco- em excesso no banho de diálise, pode levar ao aparecimento de anemia hemolítica, além de náuseas e vômitos. O acúmulo crônico está relacionado a casos de encefalopatia;
- Chumbo- os sintomas de intoxicação por chumbo são anemia hipocrômica, síndrome abdominal, síndrome neuro-muscular até a encefalopatia saturnínica que se manifesta com por sintomas de agitação e tremores, podendo evoluir para convulsões, coma e morte;
- Alumínio- se difunde através da membrana semipermeável do filtro de diálise através da ligação aos grupos hidroxila e sulfidril. A contaminação da água, acima dos níveis permitidos, leva ao acúmulo do metal e intoxicação alumínica nos pacientes renais crônicos e pode causar osteomalacia, anemia microcítica e lesão funcional aos

hepatócitos, sendo que nos casos mais severos pode evoluir com um quadro de encefalopatia, demência da diálise, catatonia e morte;

- Mercúrio- provém da contaminação ambiental pelas fábricas de cimento, siderúrgicas, além de fungicidas organomercuriais. A grande lipossolubilidade do metal leva ao acúmulo do mesmo no sistema nervoso central, causando tremores, paralisias e manifestações psiquiátricas;
- Magnésio e cálcio- conferem dureza à água. Quando em excesso na água do dialisato causam diminuição da sensibilidade da placa motora à acetilcolina e provoca bloqueio da transmissão neuro-muscular;

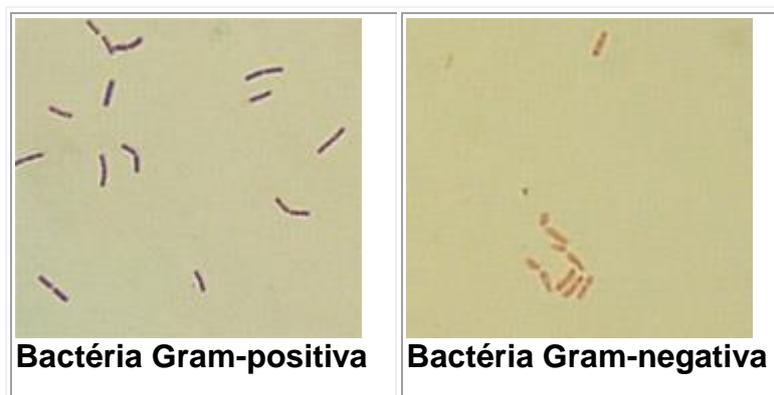
1.3.2. Contaminantes orgânicos

São compostos derivados do nitrogênio que podem ter origem vegetal, animal, industrial ou urbana. A amônia favorece a proliferação bacteriana e os nitratos e nitritos, quando ingeridos causam dor abdominal, vômitos, tonturas, cianose e choque pela formação de metahemoglobina. Os materiais orgânicos são também eliminados por deionização ou osmose reversa (SILVA *et al.*, 1996).

1.3.3. Contaminantes microbiológicos

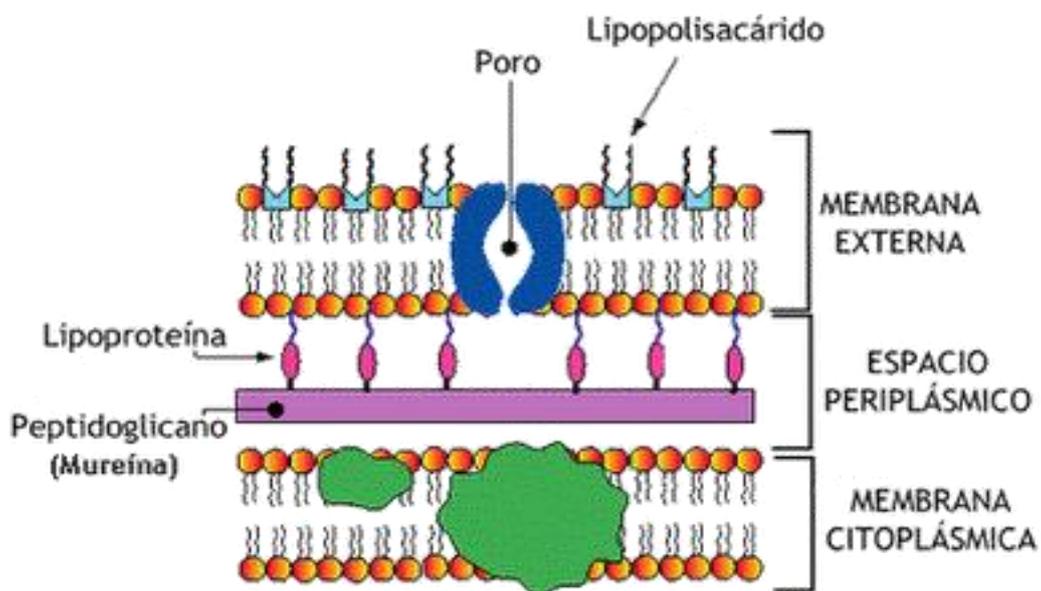
Existem basicamente dois padrões de parede celular que podem ser determinados segundo a técnica de coloração de Gram, que distingue as bactérias em Gram positivas (que coram de roxo) e Gram-negativas (que coram de rosa claro) como mostrado na Figura 2. Esta diferença ocorre devido à constituição da parede celular: as Gram-negativas têm uma camada externa de lipopolissacarídeo (LPS), além de uma fina camada interna de peptídeo-glicano (Figura 3), enquanto as Gram-positivas têm uma camada espessa de peptídeo-glicano, que ao ser desidratado pelo álcool retém o complexo cristal-violeta/lugol, no interior da célula (Figura 4).

Figura 2. Coloração Gram para identificação da parede celular de bactérias.



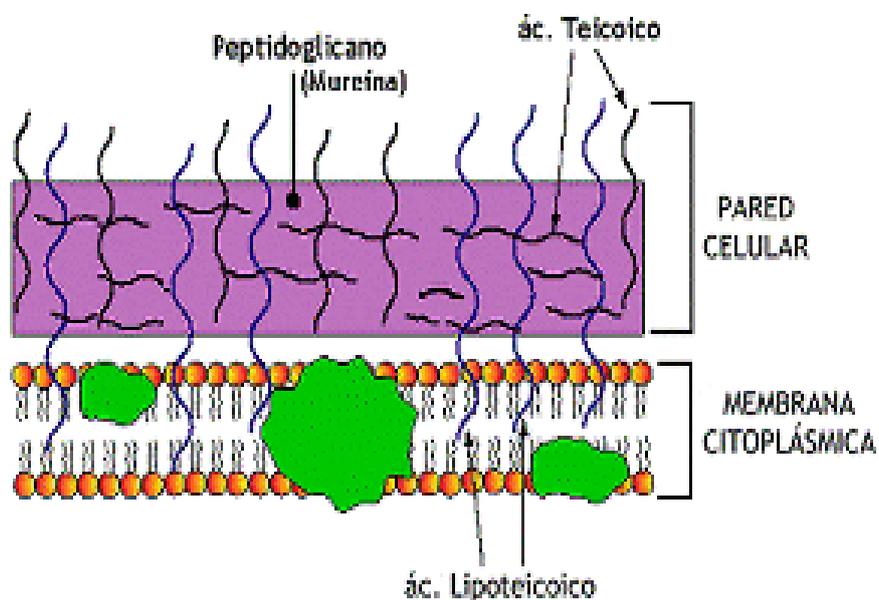
Fonte: < <http://www..grupo3-12a.blogspot.com/2010/02/caracteristic> > [Acesso em 17 de maio de 2011]

Figura 3. Parede celular de bactérias Gram-negativas.



Fonte: < http://www.phmb.info/antisepsia_e_antissepticos.html > [Acesso em 17 de maio de 2011]

Figura 4. Parede celular de bactérias Gram-positivas



Fonte: < http://www.phmb.info/antissepsia_e_antissepticos.html > [Acesso em 17 de maio de 2011]

O Quadro 1 mostra as bactérias encontradas em água de hemodiálise. As bactérias mais frequentemente encontradas em água de hemodiálise são Gram-negativas, em torno de 90%, com claro predomínio pelo gênero *Pseudomonas*.

Quadro 1. Principais espécies bacterianas encontradas na água para hemodiálise

Bactérias Gram-negativas	Bactérias Gram-positivas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Bacillus brevis</i>
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	<i>Bacillus circulans</i>
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	
<i>Brevundimonas diminuta</i>	
<i>Burkholderia cepacea</i>	
<i>Enterobacter cloacae</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Moraxella atlantae</i>	
<i>Moraxella osloensis</i>	
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	
<i>Pantoea agglomerans</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Pseudomonas sp. Ve-1</i>	
<i>Pseudomonas sp. Ve-2</i>	
<i>Ralstonia pickettii</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	

Fonte; (Ferreira, 2006)

FERREIRA (2006) constatou também que a principal espécie bacteriana isolada de amostras de água tratada para hemodiálise em clínicas do estado do Rio de Janeiro foi a *Pseudomonas aeruginosa*. Bactérias Gram negativas podem se multiplicar muito rapidamente, mesmo em água previamente esterilizada, alcançando altas concentrações (>100.000 unidades formadoras de colônia (UFC) em menos de 48 horas. Em soluções de diálise este crescimento bacteriano pode ser mais rápido, pela presença de glicose e bicarbonato, gerando altos níveis de endotoxinas. Em função do diâmetro dos poros das membranas de diálise, é pouco provável que micro-organismos (bactérias, fungos, cianobactérias) atravessem a membrana intacta, ao contrário das suas toxinas. A água para hemodiálise pode ter a presença de endotoxinas bacterianas (ou LPS) que causam várias respostas fisiológicas agudas, como febre, calafrios, cefaléia, mal-estar, mialgias, náuseas e bocejos, mas também podem determinar complicações a longo prazo, como caquexia e amiloidose, além de contribuir para a sub-diálise. Uma concentração bacteriana acima de 2000 UFC/mL, em geral, determina níveis de endotoxina suficientes para gerar os sintomas clínicos. Em altas concentrações a endotoxina atravessa a membrana do dialisador, mesmo que apresente mínimas rupturas, ou até mesmo passando através de membranas intactas, determinando sinais e sintomas desagradáveis nos pacientes. Endotoxinas adsorvem-se de modo variado à maioria das superfícies, incluindo carvão ativado, resinas, vidros, plásticos e substratos de filtros.

A monitorização longitudinal da água para hemodiálise com o teste do *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) também permite acompanhar o desempenho das membranas de osmose reversa, pois uma eventual ruptura ou a diminuição da capacidade de remoção de endotoxinas por danos à membrana (devido a depósitos, dano químico e colonização bacteriana) podem gerar elevações críticas de endotoxinas que são detectáveis pelo teste do LAL, desde que realizado frequentemente. Assim, a detecção de endotoxinas é ferramenta indispensável para uma unidade de hemodiálise avaliar, de fato, a qualidade de seu trabalho (SANTOS *et al*, 2007).

1.4. ENDOTOXINAS

Endotoxinas são macromoléculas carregadas negativamente, variando de tamanho entre 20.000 a 30.000 x 10⁶ daltons. São parte da membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas. Embora o termo endotoxina seja por vezes usado para se referir a qualquer célula associada à toxina bacteriana, o termo deve ser empregado para fazer referência ao complexo lipopolissacarídico (LPS), que está associado à membrana externa de patógenos Gram-negativos, tais como *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae* e *Bordetella pertussis* e de bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* e *Neisseria* (TODAR, 2008). As endotoxinas são substâncias altamente termoestáveis e os processos usuais de esterilização não são capazes de removê-las de superfícies e de soluções. Para inativá-las ou degradá-las devem ser utilizados ácidos, bases fortes ou temperaturas de 200° C por 1 hora ou 30 minutos a 250 °C (processo denominado despirogenização) (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

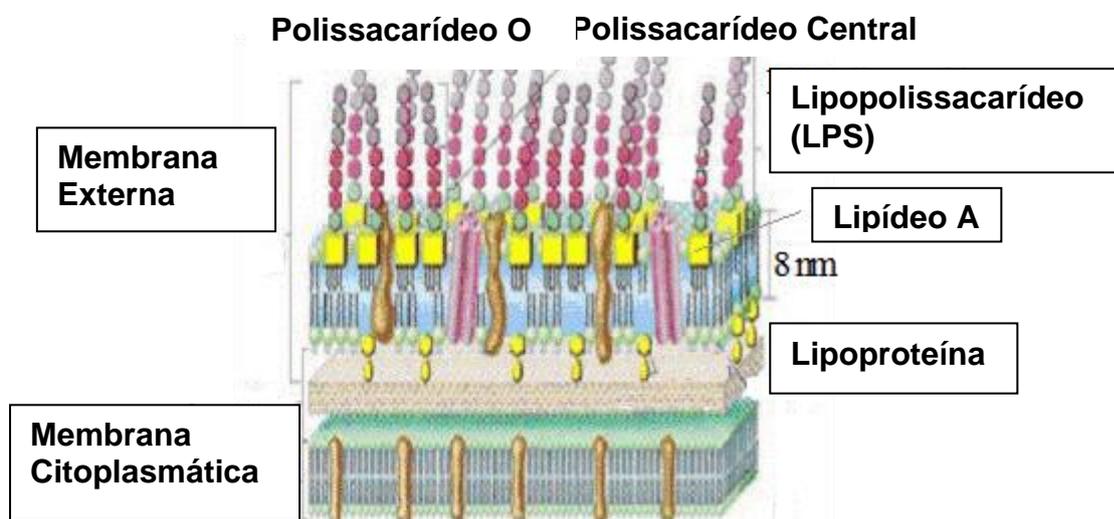
1.4.1. Natureza química da endotoxina

O LPS é composto por 3 regiões distintas: lipídeo A, antígeno central ou polissacarídeo R e antígeno somático O ou polissacarídeo O (Figura 5). A maioria dos trabalhos sobre a estrutura química de endotoxina tem sido realizada com *Escherichia coli* e espécies de *Salmonella*. O LPS pode ser extraído a partir de células inteiras pelo tratamento com fenol entre 45% e 90%. A hidrólise moderada de LPS produz lipídeo A e polissacarídeo (TODAR, 2008).

A atividade biológica da endotoxina está associada ao LPS. A toxicidade está relacionada com o componente lipídico (**lipídeo A**) e a imunogenicidade está associada com ao componente polissacarídico. Os antígenos da parede celular (**antígenos O**) são também componentes do LPS. O LPS produz uma variedade de respostas inflamatórias em animais, ativando complementos por vias alternativas (properdina), importantes na fisiopatologia de infecções por bactérias Gram-negativas. As bactérias Gram-negativas provavelmente liberam *in vivo* quantidades mínimas de LPS enquanto se multiplicam, o que pode ser

importante na estimulação da imunidade natural. Pequenas quantidades de LPS podem ser liberadas na forma solúvel em culturas recentes mantidas em laboratório. Mas, para a maioria dos pesquisadores, o LPS permanece associado com a parede celular até a desintegração da célula *in vivo* resultante de autólise, lise externa mediada pelo complemento e lisozima, e digestão fagocítica de células bacterianas (TODAR, 2008).

Figura 5. Esquema da parede celular de bactéria Gram negativa



Fonte: (Adaptado de MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003)

1.4.2. Composição química das regiões do LPS

Região I. Lipídeo A – Corresponde à região hidrofóbica do LPS, com a função de proteger a membrana. O lipídeo A consiste de um dímero fosforilado N-acetilglicosamina (NAG) com 6 ou 7 ácidos graxos (AG) ligados. Todos os AG no lipídeo A são saturados e alguns estão ligados diretamente ao dímero NAG. Sua atividade biológica parece depender de uma conformação peculiar que é determinada pelo dissacarídeo glicosamina, pelos grupos fosfato, pelas cadeias acila e do ácido 2-ceto-3-desoxioctanóico (KDO). O KDO é o único e

invariavelmente presente açúcar no LPS e por isso tem sido utilizado como um indicador em ensaios de LPS. O lipídeo A é o responsável pela ativação do teste do LAL.

Região II. Antígeno central R ou polissacarídeo R – Está ligado à posição 6 de uma NAG e está constituído por uma pequena cadeia de açúcares.

Região III. Antígeno somático O ou polissacarídeo O – Está ligado ao núcleo polissacarídico. Consiste de subunidades de oligossacarídeos compostos de 3 a 5 açúcares. O polissacarídeo O é muito maior do que o núcleo do polissacarídeo, e mantém a propriedade hidrofílica da molécula do LPS. O maior determinante antigênico da parede celular de bactérias Gram negativas reside no polissacarídeo O (TODAR, 2008).

1.4.3. Lipídeo A e virulência

As atividades fisiológicas do LPS são mediadas principalmente pelo lipídeo A. O lipídeo A tem uma potente resposta biológica modificadora que pode estimular o sistema imune de mamíferos. Durante doenças infecciosas causadas por bactérias, Gram-negativas endotoxinas ou fragmentos da membrana externa, liberados a partir da multiplicação celular, têm efeitos similares em animais e contribuem significativamente para os sintomas e patologias das doenças encontradas. Provavelmente o lipídeo A só exerce seus efeitos tóxicos quando liberado a partir da multiplicação celular em forma solúvel, ou quando a bactéria é lisada como um resultado de autólise, ingestão e morte por fagócitos, ou pela morte causada por certos tipos de antibióticos. Dentre os efeitos biológicos induzidos pelo LPS podemos citar: febre, choque, coagulação intravascular disseminada, leucopenia, leucocitoses, entre outros (TODAR, 2008).

1.5. SISTEMAS DE TRATAMENTO DA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE

A eficiência do sistema de tratamento de água (Figura 6) depende do desempenho dos componentes do equipamento, da natureza da água a ser tratada, além de variações sazonais (SILVA *et al.*, 1996).

1.5.1. Pré-tratamento da água potável

O sistema de pré-tratamento da água potável, antes da osmose reversa, também deve ser eficaz, sendo composto por filtros de areia e carvão ativado, bem como por abrandadores (para remoção de cálcio, magnésio, ferro e manganês) retendo grande parte das impurezas orgânicas e químicas, evitando-se desta forma danos às membranas de osmose reversa (LEME; SILVA, 2003).

A seguir, a finalidade de cada componente empregado no pré-tratamento:

- Filtros mecânicos – sua principal função é a remoção de partículas em suspensão, além de proteger os outros componentes empregados no tratamento da água, especialmente as membranas do equipamento de osmose reversa.
- Filtros de Carvão – sua função é adsorver cloretos, cloraminas e substâncias orgânicas
- Abrandadores – sua função é remover principalmente cálcio, magnésio e outros cátions polivalentes. Os abrandadores contêm resinas que trocam sódio por cálcio e magnésio. Além de controlar a dureza da água (cálcio e magnésio), protegem as membranas do sistema de osmose, pois a deposição de cálcio e magnésio nas membranas leva a um mal funcionamento do aparelho.

Figura 6. Sistema de purificação da água para hemodiálise: pré-tratamento e osmose reversa.



Fonte: Fotografia autorizada pelo Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas -HUPAA/UFAL, 2009.

1.5.2. Métodos de tratamento de água para hemodiálise: deionização e osmose reversa

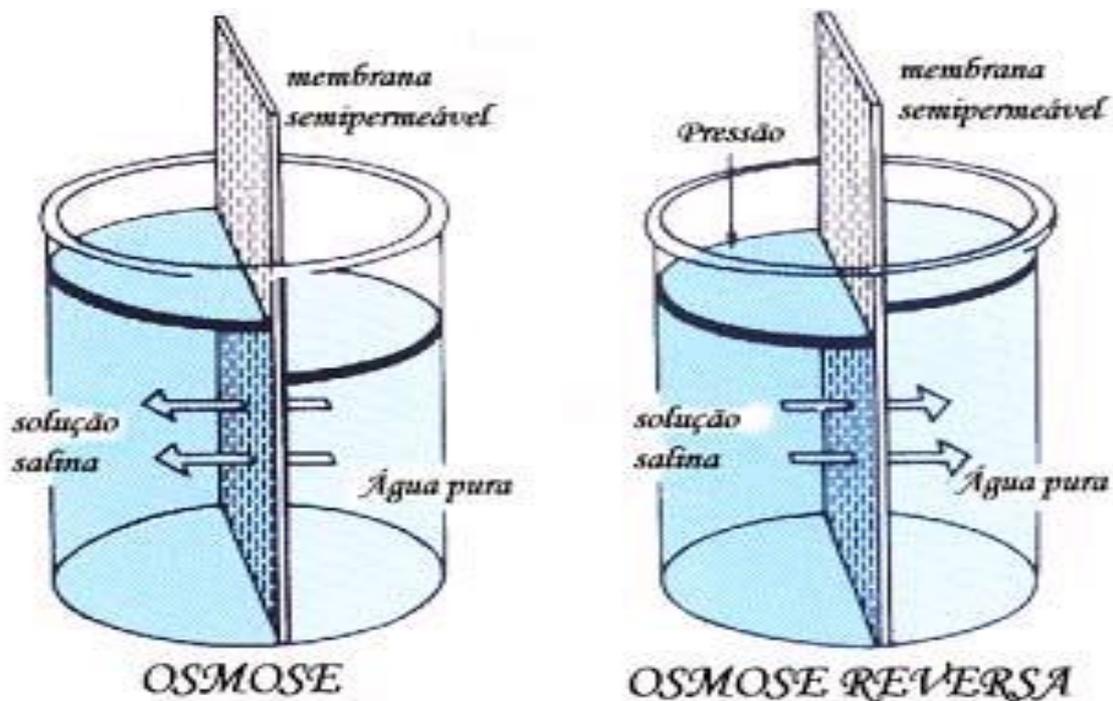
No Brasil, a água utilizada em hemodiálise é purificada basicamente por dois métodos: deionização e osmose reversa (THOMÉ *et al*, 2005):

Deionizadores – são constituídos por resinas capazes de eliminar praticamente todos os sais minerais, além de matérias orgânicas e partículas coloidais. Constituem-se de resinas catiônicas e aniônicas que fixam cátions

liberando íons hidrogênio (H^+) e fixam ânions fortes e fracos liberando íons hidroxila (OH) (SILVA *et al.*, 1996).

Osmose – é um fenômeno natural físico-químico no qual duas soluções com diferentes concentrações são colocadas em um mesmo recipiente separadas por uma membrana semi-permeável, na qual ocorre naturalmente a passagem do solvente da solução mais diluída para a mais concentrada, até que se atinja o equilíbrio. Nesse ponto, o nível da coluna do lado da solução mais concentrada estará acima do nível da coluna do lado da solução mais diluída (Figura 7). A essa diferença de nível entre colunas se denominou pressão osmótica. A osmose reversa é obtida através da aplicação mecânica de uma pressão superior à pressão osmótica, do lado da solução positiva concentrada (Figura 7). Assim sendo, osmose reversa é a denominação do processo pelo qual a água pura pode ser retirada de uma solução salina por meio de uma membrana semi-permeável, contanto que a solução em questão se encontre a uma pressão superior à pressão osmótica relacionada à sua concentração salina. A osmose reversa propicia uma água extremamente pura do ponto de vista físico, químico e bacteriológico. Retém entre 95 a 99% dos contaminantes químicos, praticamente todas as bactérias, fungos, algas e vírus, além de reter pirogênios e materiais protéicos de alto peso molecular (SILVA *et al.*, 1996).

Figura 7. Esquema dos processos físicos de osmose e osmose reversa.



Fonte: < <http://www.purosistemas.com.br> > [Acesso em 26 de maio de 2011].

Atualmente, o tratamento mais efetivo da água para hemodiálise é o sistema de osmose reversa (Figura 8). Das 643 clínicas ativas no Brasil, 76 dessas unidades estão localizadas no Estado do Rio de Janeiro. No Brasil, a maioria das clínicas, utilizam esse tratamento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2011).

Figura 8. Tratamento da água por osmose reversa em clínicas de hemodiálise



Fonte: Fotografia autorizada pelo Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas -HUPAA/UFAL, 2009.

1.6. Parâmetros de Qualidade para Água de Hemodiálise

O Quadro 2 mostra os valores máximos permitidos dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, bem como a frequência de realização das análises para a garantia de qualidade da água a ser empregada em procedimentos de hemodiálise, desde o seu tratamento, a armazenagem em reservatórios (quando imprescindíveis) e distribuição.

A RDC nº 154/2006 estabelece, desde sua primeira publicação em 2004, a concentração de endotoxina ≤ 2 EU/mL para que a água seja considerada

satisfatória para uso em diálise (BRASIL, 2006). Até 2010, a Farmacopéia Americana (USP, 33ª edição), preconizava a mesma concentração da RDC nº 154 (THE UNITED States Pharmacopeia, 2010). Porém, a partir de 2011, de acordo com a USP 34ª edição, a concentração preconizada de endotoxina passou de 2 EU/mL para 1 EU/mL (THE UNITED States Pharmacopeia, 2011). A Farmacopéia Européia estabelece um limite de concentração de endotoxina ainda mais baixo, ou seja, 0,25 EU/mL (THE EUROPEAN Pharmacopoeia, 2011)

Quadro 2. Padrão de qualidade da água tratada utilizada na preparação de solução para diálise.

Componentes	Valor máximo permitido	Frequência de análises
Coliforme total	Ausência em 100 mL	Mensal
Contagem de bactérias heterotróficas	200 UFC/mL ¹	Mensal
Endotoxinas	2 EU/mL²	Mensal
Nitrato (NO ₃)	2 mg/L	Semestral
Alumínio	0,01 mg/L	Semestral
Cloramina	0,1 mg/L	Semestral
Cloro	0,5 mg/L	Semestral
Cobre	0,1 mg/l	Semestral
Fluoreto	0,2 mg/L	Semestral
Sódio	70 mg/L	Semestral
Cálcio	2 mg/L	Semestral
Magnésio	4 mg/L	Semestral
Potássio	8 mg/L	Semestral
Bário	0,1mg/L	Semestral
Zinco	0,1mg/L	Semestral
Sulfato	100 mg/L	Semestral
Arsênico	0,005 mg/L	Semestral
Chumbo	0,005mg/L	Semestral
Prata	0,005mg/L	Semestral
Cádmio	0,001 mg/L	Semestral
Cromo	0,014 mg/L	Semestral
Selênio	0,09 mg/L	Semestral
Mercúrio	0,0002 mg/L	Semestral
Berílio	0,0004 mg/L	Semestral
Tálio	0,002 mg/L	Semestral
Antimônio	0,006 mg/L	Semestral

¹ Unidades formadoras de colônia/mL. ² Unidades de endotoxina/mL

Fonte: RDC/ANVISA n.º154, de 15/06/2004 (Republicada em 31/05/2006).

1.7. TESTE *IN VITRO* DO LISADO DE AMEBÓCITOS DO *LIMULUS* (LAL)

1.7.1. Desenvolvimento do teste do LAL

→ Década de 50- Frederick Bang observou que a infecção do *Limulus polyphemus*, era induzida por bactérias Gram-negativas, resultando na coagulação intravascular e morte do caranguejo.

→ Década de 60- Levin e Bang demonstraram que esta coagulação do sangue do *Limulus* era causada pela reação entre a endotoxina e uma proteína coagulável nos amebócitos circulantes. O método GEL-CLOT ou de gelificação começava a ser desenvolvido.

→ Década de 70- Levin e colaboradores após isolarem, purificarem e descreverem a proteína coagulável no LAL, concluíram que a reação entre o lisado e a endotoxina era de natureza enzimática.

→ Década de 80- O FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos publicou um Guia de Validação do Teste de Lisado de Amebócitos de *Limulus*, como um teste de endotoxina para produtos acabados parenterais, produtos biológicos e dispositivos médicos de uso humano e animal (CAMBREX, 2004).

1.7.2. Fundamentos do teste do LAL

O LAL é um extrato aquoso obtido após lise de células sanguíneas (amebócitos) do caranguejo ferradura, *Limulus polyphemus* (Figura 9) utilizado para detecção de endotoxina. O reagente LAL evoluiu a partir da observação dos pesquisadores Levin e Bang, que desenvolveram e prepararam um lisado que se tornou um indicador extremamente sensível à presença de endotoxina.

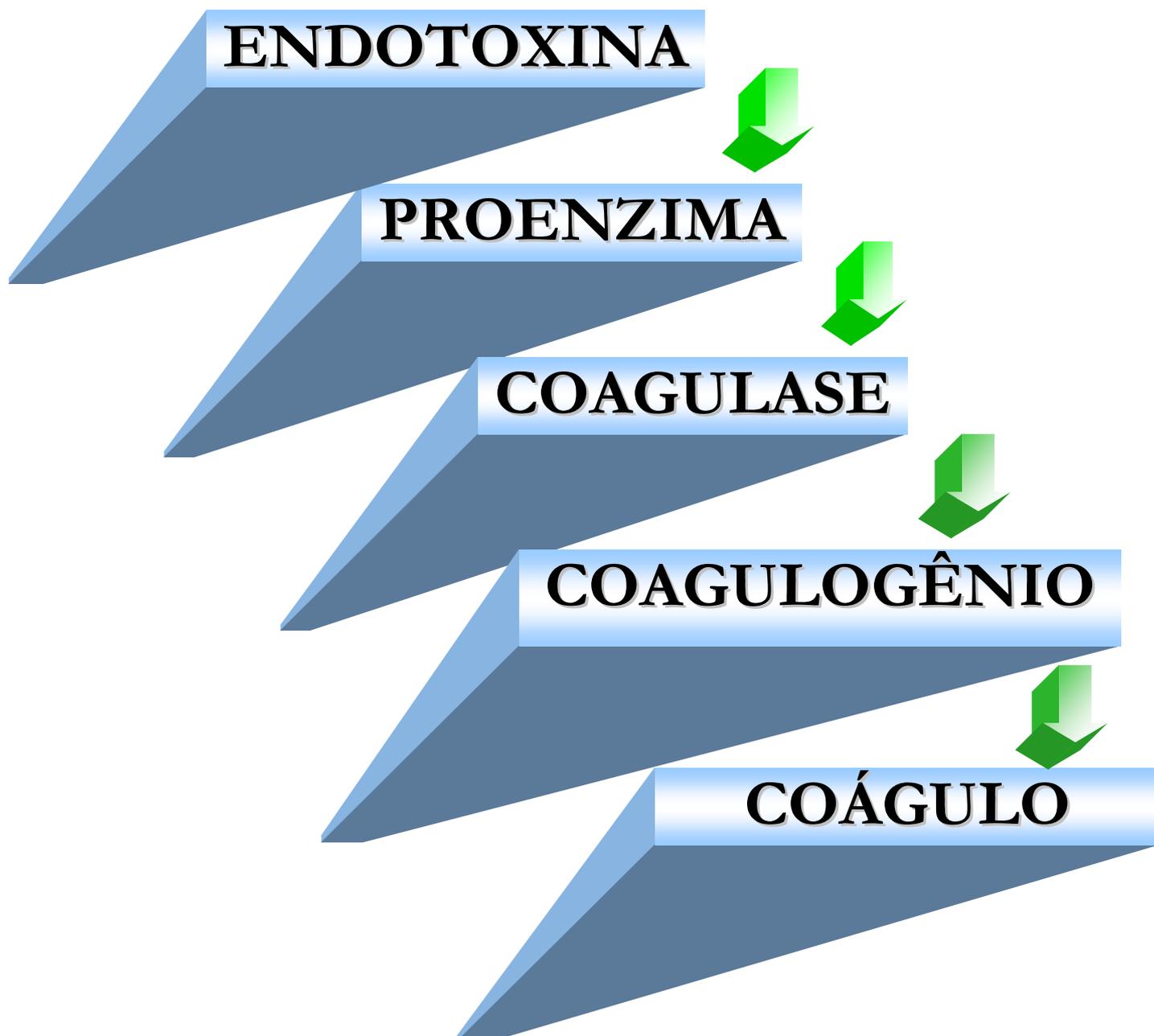
Figura 9. Processo de extração do sangue do *Limulus polyphemus*.



Fonte: < <http://www.horseshoecrab.org/med/img/EXTRACT> > [Acesso em 28 de outubro de 2011].

Young, Levin e Prendergast (1972) e Solum (1973) purificaram e caracterizaram a proteína coagulável do LAL e demonstraram a sua participação em uma reação enzimática (A CAMBREX COMPANY, 2008). A endotoxina catalisa a ativação de uma proenzima no reagente LAL. A enzima ativada (coagulase) age na proteína coagulável (coagulogênio) também presente no reagente. Este coagulogênio vai se ligar através de pontes de dissulfeto para formar o gel de reação (Figura 10).

Figura 10. Esquema do processo da formação do gel



(Adaptado do catálogo PN204, Cambrex,2004)

O teste de endotoxina bacteriana pelo método *GEL-CLOT* (gelificação) é realizado através da adição do reagente LAL, líofilo reconstituído com água apirogênica, a um volume igual da amostra a ser testada. Esse teste detecta apenas endotoxinas de bactérias Gram-negativas. (POP nº 65.3330.006- INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE).

1.8. O PAPEL DO INCQS NO CONTROLE DE QUALIDADE DA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE

O INCQS tem como missão “contribuir para promoção e recuperação da saúde e a prevenção de doenças, atuando como referência nacional para questões científicas e tecnológicas relativa ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária”. O INCQS destaca-se no âmbito nacional em função de sua presença sempre atuante e decisiva na defesa da saúde pública, tendo como responsabilidade social contribuir para a melhoria da qualidade de vida da população.

Desde 1999, o INCQS desenvolve um programa de monitoramento da qualidade da água utilizada em unidades de tratamento para hemodiálise em parceria com a Coordenação de Vigilância Sanitária do Estado do Rio de Janeiro e com a Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária do Município do Rio de Janeiro. Este programa tornou-se referência para a capacitação dos Laboratórios Centrais Brasileiros de Saúde Pública (LACENS) para análise da qualidade da água tratada para hemodiálise. Anualmente são analisadas, pelo ensaio de endotoxina LAL, aproximadamente 140 amostras provenientes das 76 clínicas existentes no Estado do Rio de Janeiro.

O monitoramento da qualidade da água utilizada em processos dialíticos é um dos mecanismos que visa à redução dos riscos aos quais fica exposto o paciente que se submete à diálise. O INCQS segue as diretrizes da RDC nº 154 (2006) da ANVISA que estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços de diálise, onde estão estabelecidos os parâmetros para a avaliação do padrão de qualidade da água utilizada nas clínicas de hemodiálise. No que tange ao ensaio do LAL ou de endotoxina bacteriana, ela estabelece o limite de 2 EU/mL.

2. JUSTIFICATIVA

A RDC nº 154/2006 determina que a coleta de água enviada para análise seja realizada atendendo às orientações do laboratório de referência responsável pelas análises (INCQS), contudo, essas orientações não são claras em relação às condições de coleta, transporte, armazenamento e principalmente quanto ao período de segurança para realização dos ensaios laboratoriais, em especial o ensaio de endotoxina bacteriana. A USP 35° Ed. (THE UNITED States Pharmacopeia, 2012) preconiza que a água utilizada para hemodiálise, após sua coleta, seja analisada em até 30 minutos ou imediatamente refrigerada e analisada em até 24 horas. Em relação ao Brasil, a determinação da USP 35° Ed. não traduz a nossa realidade, já que, as coletas na maioria das vezes são realizadas em locais distantes do laboratório de referência, inviabilizando sua pronta análise. Apesar da água coletada ficar sob refrigeração até chegar ao INCQS, ela ainda passa pelo cadastramento na sala de Amostras, e só então, é encaminhada ao laboratório para a análise, onde muitas vezes, devido à grande demanda do laboratório em analisar outros produtos, essas amostras só podem ser analisadas em períodos superiores a 24 horas. O presente estudo torna-se necessário para que possamos obter dados laboratoriais relativos à análise de endotoxina que nos permitam avaliar o quanto esse período de coleta, armazenagem, transporte, chegada ao laboratório e efetivamente análise das amostras alteram os resultados do teste do LAL.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência do tempo de armazenamento de amostras de água tratada para hemodiálise no laboratório e sua interferência na concentração de endotoxina bacteriana pelo método do LAL.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os resultados dos ensaios de endotoxina bacteriana (LAL) das amostras analisadas por período de análise (Janeiro de 2011 à Junho de 2012) em relação aos resultados satisfatórios e insatisfatórios de acordo com os parâmetros da RDC 154/2006.
- Avaliar os resultados dos ensaios de endotoxina bacteriana (LAL) das amostras analisadas por período de análise (Janeiro à Junho de 2012) em relação aos resultados por concentração de endotoxina de acordo com os parâmetros da RDC 154/2006.
- Avaliar os resultados dos ensaios de endotoxina bacteriana (LAL) das amostras analisadas por período de análise (Janeiro à Junho de 2012) em relação aos resultados por concentração de endotoxina de acordo com os parâmetros da USP 35/2012.
- Definir critérios para coleta, acondicionamento e armazenamento das amostras de água tratada para hemodiálise.
- Estabelecer um prazo limite desde a coleta das amostras de água tratada para hemodiálise até sua análise final pelo ensaio de Endotoxina Bacteriana (LAL), visando a garantia nos resultados das análises.

4. METODOLOGIA

Foram analisadas 26 amostras de água tratada para hemodiálise (13 amostras da Sala de Reuso e 13 do ponto de Pós-Osmose) provenientes de 13 clínicas localizadas no Estado do Rio de Janeiro, monitoradas pela Coordenação de Vigilância Sanitária do Estado do Rio de Janeiro e Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária do Município do Rio de Janeiro.

4.1. PROCEDIMENTO DE COLETA DAS AMOSTRAS:

- a) Os frascos (vidros de borossilicato) utilizados para coleta e armazenagem das amostras foram preparados e despirogenizados (POP nº 65.3330.015 – Lavagem de Material para o Ensaio de Endotoxina Bacteriana) pelo laboratório de endotoxina bacteriana do DFT/INCQS;
- b) Na higienização das torneiras para coleta das amostras foi utilizada gaze embebida em álcool à 70%. Após a desinfecção das torneiras, deixou-se escoar a água por cerca de 3 minutos e então foi realizada a coleta das amostras. O frasco foi aberto somente no momento da coleta da amostra e fechado posteriormente. No momento da remoção da tampa juntamente com o papel protetor, observaram-se os seguintes cuidados:
 - não tocar na parte interna da tampa e do frasco;
 - não colocar a tampa no chão ou sobre outra superfície;
 - não falar, tossir ou espirrar próximo ao frasco de coleta;
- c) coletou-se aproximadamente 125 mililitros de água para cada amostra.
- d) os frascos foram identificados com o nome do ponto de coleta correspondente ao “Auto de Coleta”, que foi preenchido com todos os dados solicitados;
- e) a amostra foi acondicionada em caixa térmica, com gelo reciclável, de forma adequada para que não ocorressem perdas durante o transporte;
- f) para coleta foram utilizados os equipamentos de proteção individual: luva descartável e avental.

4.2. ACONDICIONAMENTO DE AMOSTRAS DE ÁGUA PARA HEMODIÁLISE

Com base na Farmacopéia Européia, 2008 e Farmacopéia Americana, 2009, as embalagens de vidro destinadas ao acondicionamento de produtos farmacêuticos podem ser classificadas em quatro categorias, de acordo com o tipo de vidro e sua aplicação, sendo o tipo I adequado para amostras de água tratada para hemodiálise, já que, as embalagens de vidro tipo I são, em geral, utilizadas para todas as preparações de uso parenteral e para uso como recipientes de vidro utilizados no acondicionamento de sangue humano ou componentes de sangue. Trata-se de vidro neutro do tipo borossilicato, não alcalino, de alta resistência térmica, mecânica e hidrolítica, com alcalinidade de até 1,0 mL de H₂SO₄, (0,01 mol/L³) (teste em vidro moído), como também, destinado ao acondicionamento de medicamentos para aplicações intravasculares e uso parenteral.

4.3. AMOSTRAGEM, PONTOS DE COLETA E PERIODICIDADE DAS ANÁLISES

De acordo com o Guia para utilização da norma (ABNT, 1985) NBR 5426 – Planos de amostragem e procedimentos na inspeção por atributos, foi estabelecido um “n amostral” de 13 amostras para cada ponto (Pós-osmose e Reuso), considerando-se 2 pontos de coleta, onde foram analisadas um total de 26 amostras pertencentes a um “lote” de 59 amostras com entrada para análise no primeiro semestre de 2012 no laboratório para o teste de endotoxina bacteriana(LAL), levando-se em consideração um nível de inspeção grau II, e tamanho de lote de 51 a 90. As amostras da água para análise no ensaio de endotoxina bacteriana foram coletadas no ponto contíguo à máquina de hemodiálise, após o tratamento (osmose reversa), ou seja, ponto de pós-osmose (Figura 11) e na água utilizada no reprocessamento dos dialisadores, sala de reuso (Figura 12), em frascos Tipo I despirogenizados de acordo com o POP (Procedimento Operacional Padronizado) de nº 65.3330.001 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE) Cada amostra recebida no laboratório foi alicotada em 5 (cinco) frascos, sendo 03 (três) frascos para as análises de 24h, 7 dias e 14 dias, armazenadas em

temperatura ambiente entre 20 a 25°C. Para as amostras armazenadas sob refrigeração de 2 a 8°C, manteve-se o frasco original de coleta para a análise de 24 horas e os outros dois restantes para análise de 7 e 14 dias. Todas as amostras foram alicotadas em fluxo laminar.

Figura 11. Ponto de coleta contíguo à máquina de hemodiálise - Pós Osmose.



Fonte: Fotografia autorizada pelo Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da [Universidade Federal de Alagoas](#) -HUPAA/UFAL, 2009.

Figura 12. Ponto de coleta de água em procedimento de hemodiálise -
Sala de reuso



Fonte: Fotografia autorizada pelo Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas -HUPAA/UFAL, 2009.

4.4. MATERIAL E INSUMOS PARA O LAL

- a) lisado liofilizado para 50 testes (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.)
- b) endotoxina padrão de *Escherichia coli* (Controle positivo) (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.)

- c) água apirogênica (Controle negativo) (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.)
- d) tubos de vidro (borossilicato) de 10 X 75 mm, com fundo redondo;
- e) tubos de vidro (borossilicato) de 12 X 100 mm;
- f) estufa para despirogenização que opere na faixa de temperatura de 200 a 250° C;
- g) banho-maria sem agitação mantido à temperatura de $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{ C}$;
- h) pipeta de 10 mL apirogênica, descartável, embalagem individual;
- i) micropipetas de volume fixo: 10, 100, 200, 500 e 1000 μL ;
- j) micropipetas de volume variável: 50 - 200 μl , 200 - 1000 μL ;
- k) ponteiras apirogênicas, descartáveis em embalagem individual;
- l) pipeta distribuidora, compatível com ponteira de 5 mL;
- m) ponteira apirogênica, descartável, em embalagem individual, compatível com pipeta distribuidora e com capacidade para 5 mL;
- n) agitador de tubos tipo *Vortex*;
- o) *parafilm*;
- p) pHmetro ou papel indicador de pH;
- q) cronômetro;

- r) estantes para os tubos de vidro;
- s) amostras de água tratada para hemodiálise: pós-osmose e reuso;
- t) fluxo laminar FT 0201;
- u) frascos erlenmeyer.

4.5. CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO LIMITE DE ENDOTOXINA (CLE) NO ENSAIO DO LAL

Cada produto tem o seu próprio limite de endotoxina (pré-estabelecido em Farmacopéias ou legislações específicas), calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$CLE = K (EU / kg) / M (mL / kg)$, onde;

K = é um valor constante igual a 5,0;

M = é a dose humana máxima / kg de peso corporal, que pode ser administrado em um período de uma única hora, considera-se 70 Kg como sendo o peso médio humano. O resultado é expresso em EU/mL em Unidades de Endotoxina (EU) por mililitro ou EU/mg em Unidades de Endotoxina (EU) por miligrama.

Via de administração Específica	K (E.U. por Kg por hora)
intravenosa	5,0
intratecal	0,2
radiofármacos	0,2

Exemplo: Solução de Cloreto de Sódio 0,9%

Dose máxima por Kg: 10 mL/Kg

$$CLE = \frac{K(EU / Kg)}{M(mL / Kg)} = \frac{5EU / Kg}{10mL / Kg} = 0,5EU / mL$$

Portanto, uma solução de Cloreto de Sódio 0,9% deve conter não mais do que 0,5 EU/mL.

4.6. CÁLCULO DA MÁXIMA DILUIÇÃO VÁLIDA (MDV) NO ENSAIO DO LAL

Cada produto, a partir de sua CLE, possui uma diluição válida permitida para que atenda as especificações do ensaio de LAL, estabelecida pela fórmula abaixo:

$$\text{MDV} = \text{CLE (EU/mL)} / \lambda \text{ (EU/mL)}$$

λ é a sensibilidade declarada no frasco do reagente LAL pelo produtor. Em nossos ensaios utilizamos $\lambda = 0,125 \text{ EU / mL}$

No caso da água tratada para hemodiálise a CLE é = 2 EU/mL

Logo: $\text{MVD} = 2 \text{ EU/mL} / 0,125 \text{ EU/mL}$

MVD= 1:16

4.7. EXECUÇÃO DO ENSAIO

O teste de endotoxina bacteriana pelo método de gelificação será realizado segundo POP n° 65.3330.006 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE).

O volume de 0,1 mL da amostra pura ou na diluição de trabalho será adicionado ao tubo de reação (10 X 75 mm). A seguir, 0,01 mL de solução de endotoxina padrão na concentração de 2λ (0,25 EU/mL) será adicionada aos controles positivos. A cada ensaio serão incluídos controles positivo e negativo, utilizando-se 0,1 mL da água apirogênica, utilizada na reconstituição dos padrões e diluição da amostra testada. O passo final consistirá na adição de 0,1 mL do reagente LAL preparado de acordo com o estabelecido pelo fabricante (Cambrex Bio Science, Walkersville Inc., MD USA) assegurando-se que o tempo de distribuição do reativo (LAL) não exceda 2 minutos para todos os tubos. A seguir, os tubos serão incubados à $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 1 hora \pm 2 minutos em banho-maria. Os tubos devem ficar cerca de 3 cm imersos na água do

banho. Após 1 hora de incubação, cada tubo será retirado cuidadosamente do banho-maria e invertido lentamente até formar um ângulo de 180°. Se um gel firme é formado no fundo do tubo, o ensaio é considerado positivo (+), porém se ao inverter o tubo, o mesmo apresentar no fundo um aspecto mole ou um pouco fluido, não caracterizando um gel firme, o ensaio é considerado negativo (-) para a presença de endotoxina.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

As 13 amostras coletadas no ponto de Pós osmose e mantidas sob refrigeração (Tabela 1), apresentaram, após análise, uma concentração de endotoxina $< 0,125$ EU/mL nas leituras de 24 horas, 7 dias e 14 dias. A única exceção ocorreu com a amostra nº 6 que apresentou na leitura de 14 dias uma concentração de endotoxina $> 0,125$ e $< 1,25$ EU/mL. Apesar da amostra nº 6 apresentar um resultado diferente das demais amostras na análise de 14 dias, todas as amostras coletadas no ponto de Pós osmose e mantidas sob refrigeração foram consideradas satisfatórias (100%) segundo os critérios da RDC nº 154. De acordo com o programa de estatística GraphPad Prism versão 5.04 de 2011, observando-se um intervalo de confiança de 95%, com p valor de 0.0005, os resultados encontrados foram considerados não significativos estatisticamente (Figura 13).

Para as 13 amostras coletadas no ponto de Pós osmose e mantidas à temperatura ambiente (Tabela 1), somente as amostras nº 2, 8 e 17 foram consideradas satisfatórias, porém não apresentando resultados homogêneos entre elas. A amostra nº 2 apresentou na análise de 24 horas, 7 dias e 14 dias uma concentração de endotoxina $> 0,125$ e $< 1,25$ EU/mL. A amostra nº 8 apresentou em todos os períodos de análise (24 horas, 7 dias e 14 dias) uma concentração de endotoxina $< 0,125$ EU/mL. Já a amostra nº 17 apresentou nas análises de 24 horas e 7 dias uma concentração de endotoxina $< 0,125$ EU/mL, contudo em 14 dias essa concentração foi $> 0,125$ e $< 1,25$ EU/mL. Em relação as amostras consideradas insatisfatórias, as de nº 4,6,10,11,15, 21 e 23 apresentaram insatisfatoriedade nas análises de 7 dias, com a concentração de endotoxina variando entre $> 2,5$ EU/mL e < 80 EU/mL. Com 14 dias de análise, as amostras nº 13, 19 e 25 foram consideradas insatisfatórias, com concentrações de endotoxina variando entre > 5 EU/mL e < 40 EU/mL. Das 13 amostras analisadas 23,1% foram consideradas satisfatórias, sendo 73,9% consideradas insatisfatórias quando deixadas em temperatura ambiente, segundo os critérios da RDC nº 154. De acordo com o programa de estatística GraphPad Prism versão 5.04 de 2011, observando-se um intervalo de confiança de 95%, com p valor de 0.0005, os resultados encontrados foram considerados significativos estatisticamente (Figura 14).

Figura 13. Resultados dos ensaios do LAL em amostras de água coletadas no ponto de pós-osmose 1,7 e 14 dias após manutenção em geladeira à temperatura de $(5,9\pm 0,5^\circ\text{C})$.

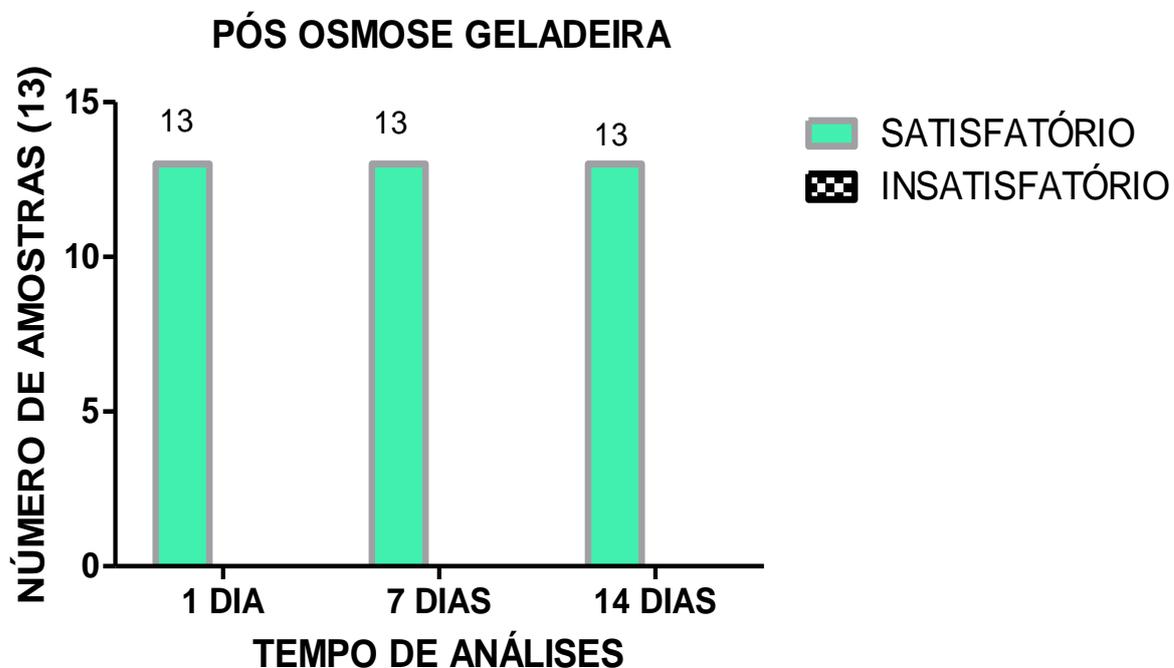


Figura 14. Resultados dos ensaios do LAL em amostras de água coletadas no ponto de pós-osmose 1,7 e 14 dias após manutenção à temperatura ambiente $(22,6\pm 0,7^\circ\text{C})$

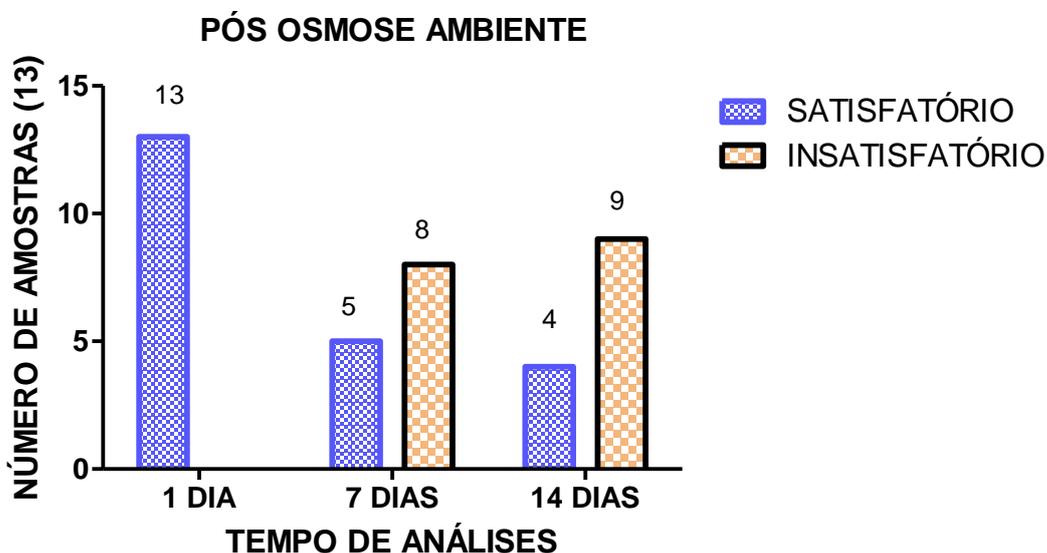


Tabela 1- Amostras analisadas no ponto de Pós osmose, mantidas em geladeira e temperatura ambiente.

Amostras	PÓS OSMOSE GELADEIRA			RESULTADO	PÓS OSMOSE AMBIENTE			RESULTADO
	24 HORAS	7 DIAS	14 DIAS		24 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	
4	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO	< 0.125EU/mL	> 2.5 E < 5 EU/mL	< ou = 5 EU/mL	INSATISFATORIO
6	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	>0.125 e < 1.25 EU/mL	SATISFATORIO	>0.125 e < 1.25 EU/mL	>5 EU/mL	< ou = 2.5 EU/mL	INSATISFATORIO
8	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO
10	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO	< 0.125EU/mL	>5 EU/mL	>20 EU/mL	INSATISFATORIO
11	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO	< 0.125EU/mL	> 2.5 E < 5 EU/mL	> 2.5 e < 5 EU/mL	INSATISFATORIO
13	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO	< 0.125EU/mL	>0.125 e < 1.25 EU/mL	>5 EU/mL	INSATISFATORIO
15	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO	< 0.125EU/mL	>2. 5 EU/mL	> 5 EU/mL	INSATISFATORIO
17	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	>0.125 e < 1.25 EU/mL	SATISFATORIO
19	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	> 20 E < 40 EU/mL	INSATISFATORIO
21	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO	< 0.125EU/mL	> 2.5 E < 5 EU/mL	< 0.125EU/mL	INSATISFATORIO
23	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO	< 0.125EU/mL	> 40 E < 80 EU/mL	> 5 E < 10 EU/mL	INSATISFATORIO
25	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATORIO	< 0.125EU/mL	>0.125 e < 1.25 EU/mL	> 5 EU/mL	INSATISFATORIO

As 13 amostras coletadas no ponto de Reuso e mantidas sob refrigeração (Tabela 2), apresentaram, após análise, uma concentração de endotoxina $< 0,125$ EU/mL nas amostras nº 1,5,7,12,14,16,18,20,22,24 e 26, nas leituras de 24 horas, 7 dias e 14 dias. As únicas exceções ocorreram nas amostras nº 3 e 9 que apresentaram na leitura de 24 horas uma concentração de endotoxina $> 0,125$ e $< 1,25$ EU/mL. Nos demais dias de análise (7 e 14 dias) suas concentrações mantiveram-se $< 0,125$ EU/mL. Apesar das amostras nº 3 e 9 apresentarem resultados diferentes das demais amostras na análise de 24 horas, todas as amostras coletadas no ponto de Reuso e mantidas sob refrigeração foram consideradas satisfatórias (100%) segundo os critérios da RDC nº 154. De acordo com o programa de estatística GraphPad Prism versão 5.04 de 2011, observando-se um intervalo de confiança de 95%, com p valor de 0.0005, os resultados encontrados foram considerados não significativos estatisticamente (Figura 15).

Para as 13 amostras coletadas no ponto de Reuso e mantidas à temperatura ambiente (Tabela 2), somente as amostras nº 3 e 9 mantiveram-se satisfatórias com 24 horas, 7 e 14 dias, com concentrações de endotoxina variando entre $> 0,125$ EU/mL e $< 1,25$ EU/mL em 24 horas e 7 dias. Na análise de 14 dias, ambas as amostras apresentaram resultados $< 0,125$ EU/mL. Nas análises de 24 horas, as amostras nº 1, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 e 26 apresentaram uma concentração de endotoxina $< 0,125$ EU/mL e as amostras nº 5 e 7 apresentaram uma concentração de endotoxina variando entre $> 0,125$ EU/mL e $< 1,25$ EU/mL. Em relação as amostras consideradas insatisfatórias, as de nº 1, 5, 7, 12, 14, 16, 20, 22, 24 e 26 apresentaram insatisfatoriedade nas análises de 7 dias, com as concentrações de endotoxina variando desde $> 2,5$ EU/mL até > 100 EU/mL. Somente a amostra nº 18 apresentou insatisfatoriedade aos 14 dias, obtendo uma concentração de endotoxina > 5 EU/mL. Em relação às análises de 14 dias, as amostras nº 14, 16, 18, 20, 22 tiveram aumento em suas concentrações de endotoxina variando entre $> 2,5$ EU/mL e < 100 EU/mL. Já as amostras nº 1, 5 e 12 nas análises de 14 dias apresentaram redução nas concentrações de endotoxina em relação às análises de 7 dias, com uma variação de concentração de endotoxina entre $> 0,125$ EU/mL e $< 1,25$ EU/mL. As amostras nº 3, 7 e 9 nas análise de 14 dias, apresentaram redução nas concentrações de endotoxina em relação às

análises de 7 dias, com uma concentração de endotoxina $< 0,125$ EU/mL. As amostras nº 24 e 26 nas análises de 14 dias apresentaram redução nas concentrações de endotoxina em relação às análises de 7 dias, com uma variação de concentração de endotoxina variando entre > 50 EU/mL e < 100 EU/mL, e $> 2,5$ e < 5 EU/mL respectivamente. A amostra nº 22 manteve as mesmas concentrações de endotoxina aos 7 e 14 dias, ou seja, $> 2,5$ e < 5 EU/mL. A diminuição da concentração de endotoxina em alguns casos pode estar associado a alguns fatores tais como intensa adsorção à parede do recipiente de coleta ou mesmo uma diminuição no crescimento (multiplicação) bacteriano, variando de acordo com a bactéria Gram negativa presente na água.

Das 13 amostras analisadas 15,4% foram consideradas satisfatórias, sendo 84,6% consideradas insatisfatórias quando deixadas em temperatura ambiente, segundo os critérios da RDC nº 154. De acordo com o programa de estatística GraphPad Prism versão 5.04 de 2011, observando-se um intervalo de confiança de 95%, com p valor de 0.0003, os resultados encontrados foram considerados significativos estatisticamente (Figura 16).

Com o presente estudo podemos observar que as amostras mantidas em geladeira em ambos os pontos de coleta, sala de Reuso e Pós osmose, mantiveram-se satisfatórias em todos os períodos de análise (24 horas, 7 dias e 14 dias). Em relação às amostras coletadas nos pontos da sala de Reuso e Pós osmose e mantidas à temperatura ambiente, podemos observar a insatisfatoriedade a partir das análises de 7 e 14 dias.

Figura 15. Resultados dos ensaios do LAL em amostras de água coletadas no ponto de Reuso 1,7 e 14 dias após manutenção em geladeira à temperatura de $(5,9\pm 0,5^{\circ}\text{C})$.

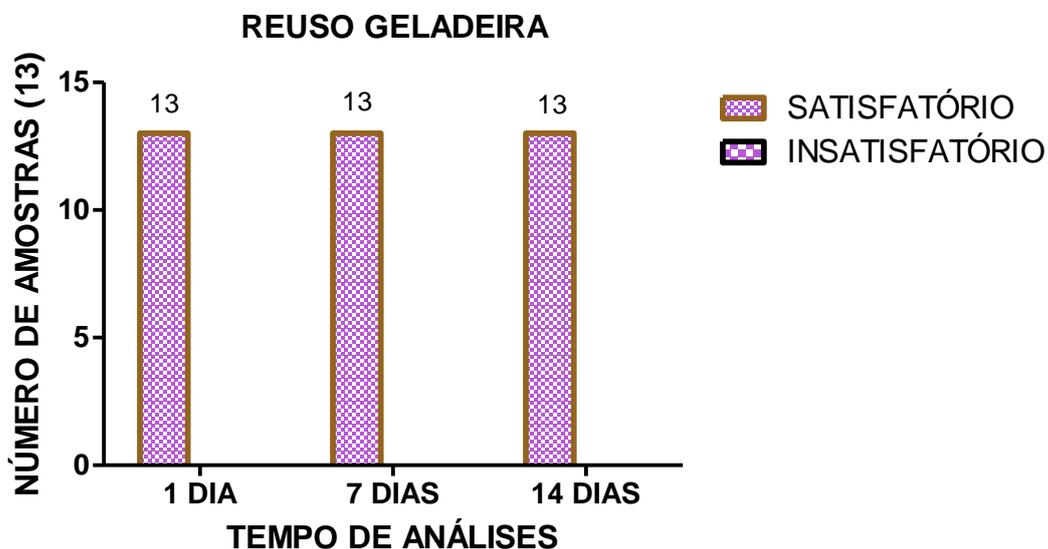


Figura 16. Resultados dos ensaios do LAL em amostras de água coletadas no ponto de Reuso 1,7 e 14 dias após manutenção à temperatura ambiente $(22,6\pm 0,7^{\circ}\text{C})$.

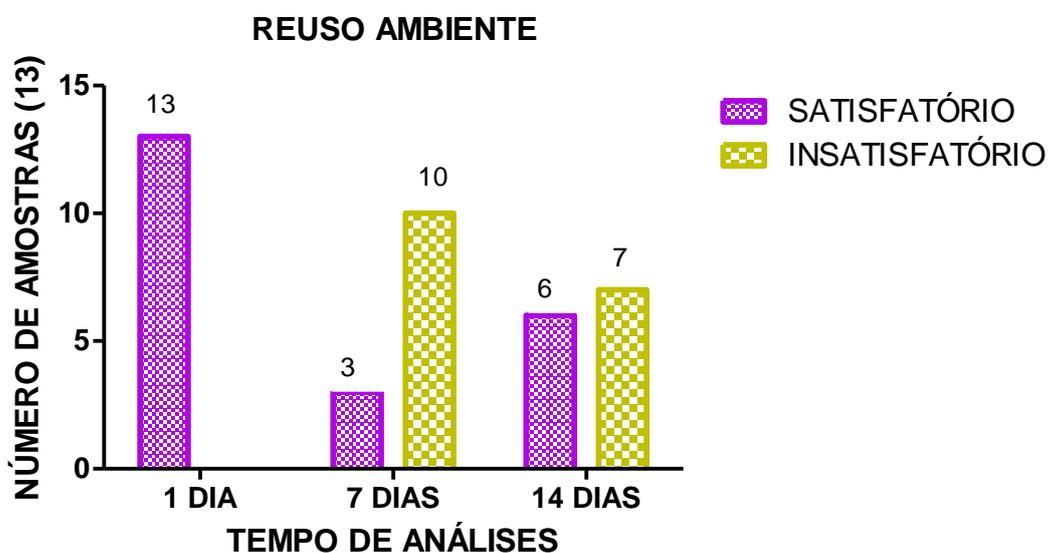


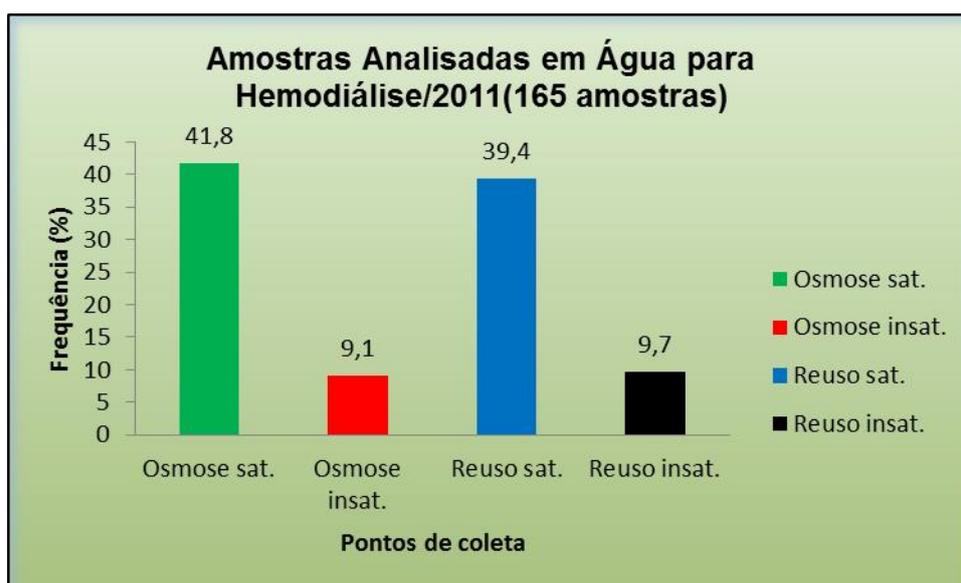
Tabela 2- Amostras analisadas no ponto de Reuso, mantidas em geladeira e temperatura ambiente

AMOSTRA	REUSO GELADEIRA			RESULTADO	REUSO AMBIENTE			RESULTADO
	24 HORAS	7 DIAS	14 DIAS		24 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	
1	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	< 0.125EU/mL	>5 EU/mL	>0.125 e < 1.25 EU/mL	SATISFATÓRIO
3	>0.125 e < 1.25 EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	>0.125 e < 1.25 EU/mL	>0.125 e < 1.25 EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO
5	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	>0.125 e < 1.25 EU/mL	> 2.5 E < 5 EU/mL	>0.125 e < 1.25 EU/mL	INSATISFATÓRIO
7	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	>0.125 e < 1.25 EU/mL	>5 EU/mL	< 0.125EU/mL	INSATISFATÓRIO
9	>0.125 e < 1.25 EU/mL.	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	>0.125 e < 1.25 EU/mL	>0.125 e < 1.25 EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO
12	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	< 0.125EU/mL	> 2.5 E < 5 EU/mL	>0.125 e < 1.25 EU/mL	INSATISFATÓRIO
14	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	< 0.125EU/mL	< ou = 5 EU/mL	> 10 EU/mL	INSATISFATÓRIO
16	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	< 0.125EU/mL	>2. 5 EU/mL	> 5 EU/mL	INSATISFATÓRIO
18	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	< 0.125EU/mL	>0.125 e < 1.25 EU/mL	> 5 EU/mL	INSATISFATÓRIO
20	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	< 0.125EU/mL	> 5 E < 10 EU/mL	> 20 E < 40 EU/mL	INSATISFATÓRIO
22	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	< 0.125EU/mL	> 2.5 E < 5 EU/mL	> 2.5 E < 5 EU/mL	INSATISFATÓRIO
24	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	< 0.125EU/mL	> 100 EU/mL	> 50 E < 100 EU/mL	INSATISFATÓRIO
26	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	< 0.125EU/mL	SATISFATÓRIO	< 0.125EU/mL	> 10 E < 20 EU/mL	> 2.5 E < 5 EU/mL	INSATISFATÓRIO

Com o presente estudo podemos observar que as amostras mantidas em geladeira em ambos os pontos de coleta, sala de Reuso e Pós osmose, mantiveram-se satisfatórias em todos os períodos de análise (24 horas, 7 dias e 14 dias). Em relação às amostras coletadas nos pontos da sala de Reuso e Pós osmose e mantidas à temperatura ambiente, podemos observar a insatisfatoriedade a partir das análises de 7 e 14 dias.

De acordo com o limite de endotoxina de 2 EU/mL preconizado pela RDC nº 154 de 15 de junho de 2004 (republicada em 2006) para água tratada para hemodiálise, foram analisadas 165 amostras dos 2 pontos de coleta (Sala de Reuso e Pós osmose) . Nos resultados obtidos no ponto de coleta da Pós-osmose, verificou-se que 41,8% das amostras estavam satisfatórias e apenas 9,1% foram consideradas insatisfatórias (Figura17). Para o ponto de coleta da sala de Reuso, observamos um percentual de 39,4% para as amostras satisfatórias, enquanto 9,7% responderam por resultados insatisfatórios (Figura 17).

Figura 17. Amostras analisadas de Água para Hemodiálise de Janeiro a Dezembro de 2011 (165 amostras) pelo método de gelificação do teste do LAL.



Das 165 amostras analisadas em 2011 nos pontos de Reuso e Pós osmose foi também observado o comportamento das amostras por faixa de concentração de endotoxina, com 56,9% das amostras satisfatórias apresentando resultados $< 0,125$ EU/mL, 23,6% obtiveram resultado satisfatório $> 0,125$ e < 1 EU/mL e 19,5% apresentaram uma concentração de endotoxina acima de 1 EU/mL (Figura 18). Segundo essas observações, podemos verificar que 80,5% das amostras satisfatórias apresentaram uma concentração de endotoxina ≤ 1 EU/mL, concentração preconizada pela Farmacopeia Americana, USP 35 e apenas 19,5% das amostras analisadas foram insatisfatórias (Figura 19).

Figura 18. Amostras analisadas de Água para Hemodiálise de Janeiro a Junho de 2012 (59 amostras) pelo método de gelificação do teste do LAL

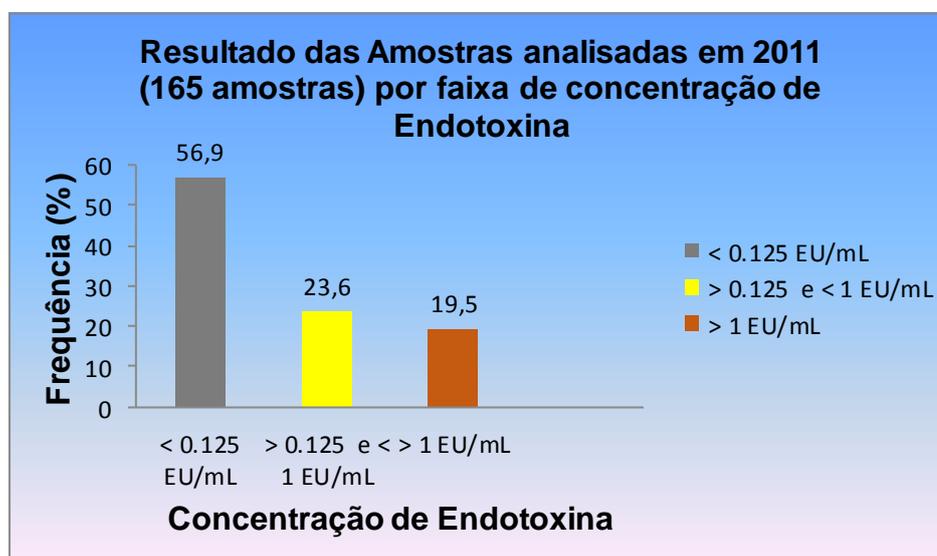
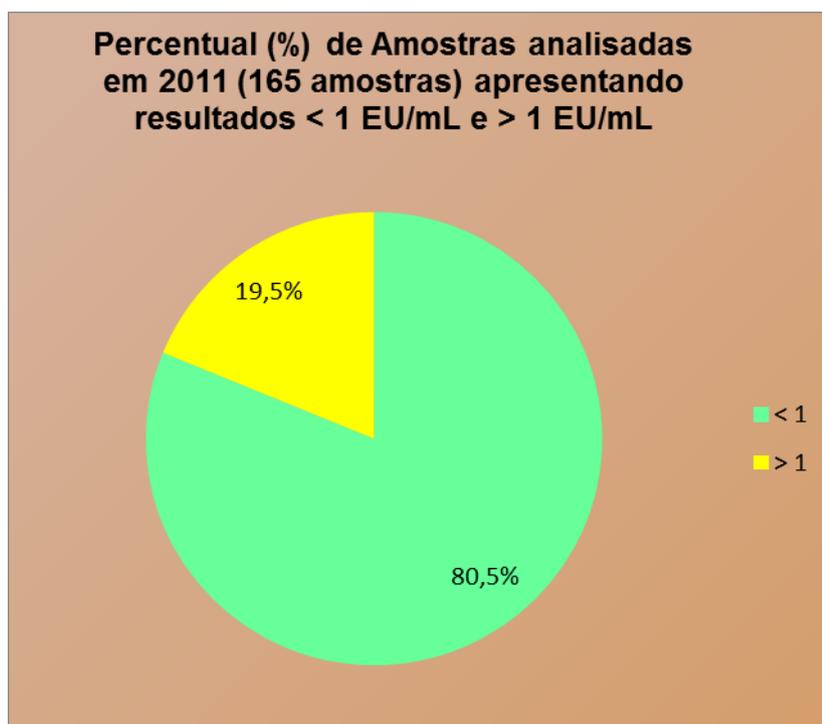
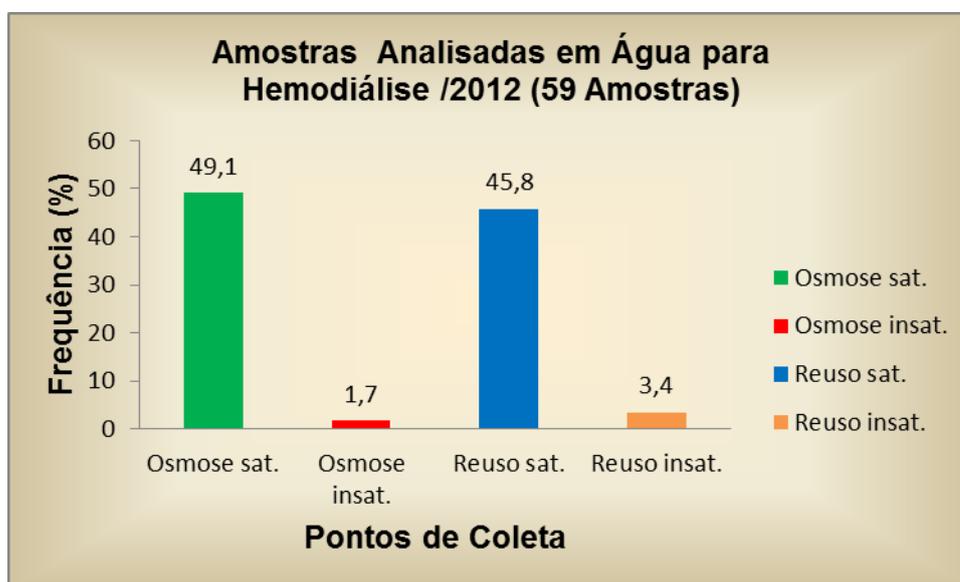


Figura 19. Amostras analisadas de Água para Hemodiálise de Janeiro a Junho de 2012 (59 amostras) por faixa de concentração de endotoxina através do teste do LAL –método de gelificação.



No período de Janeiro a Junho de 2012, foram analisadas 59 amostras (Pós osmose e Reuso). No ponto de coleta da Pós-osmose, verificamos que 49,1% das amostras foram consideradas satisfatórias e apenas 1,7% destas foram consideradas insatisfatórias (Figura 18). Para o ponto de coleta da sala de reuso, observou-se um percentual de 45,8% para as amostras satisfatórias, enquanto 3,4% responderam por resultados insatisfatórios (Figura 20).

Figura 20. Percentual de amostras de água para hemodiálise analisadas em 2012 com resultados variando entre < 1 EU/mL e > 1 EU/mL.



Das 59 amostras analisadas em 2012 nos pontos de Reuso e Pós osmose foi também observado o comportamento das amostras por faixa de concentração de endotoxina, com 74,5% das amostras satisfatórias apresentando resultados < 0,125 EU/mL, 17% obtiveram resultado satisfatório > 0,125 e < 1 EU/mL, 3,4% apresentaram resultado \leq 1,25 EU/mL, e 5,1% apresentaram resultado insatisfatório acima de 2 EU/mL (Figura 21). Segundo essas observações, podemos verificar que 91,5% das amostras satisfatórias apresentaram uma concentração de endotoxina \leq 1 EU/mL, concentração preconizada pela Farmacopeia Americana, USP 35 e apenas 8,5% das amostras analisadas foram insatisfatórias (Figura 22).

Figura 21. Amostras analisadas em Água para Hemodiálise/2012 (59 amostras) por faixa de concentração.

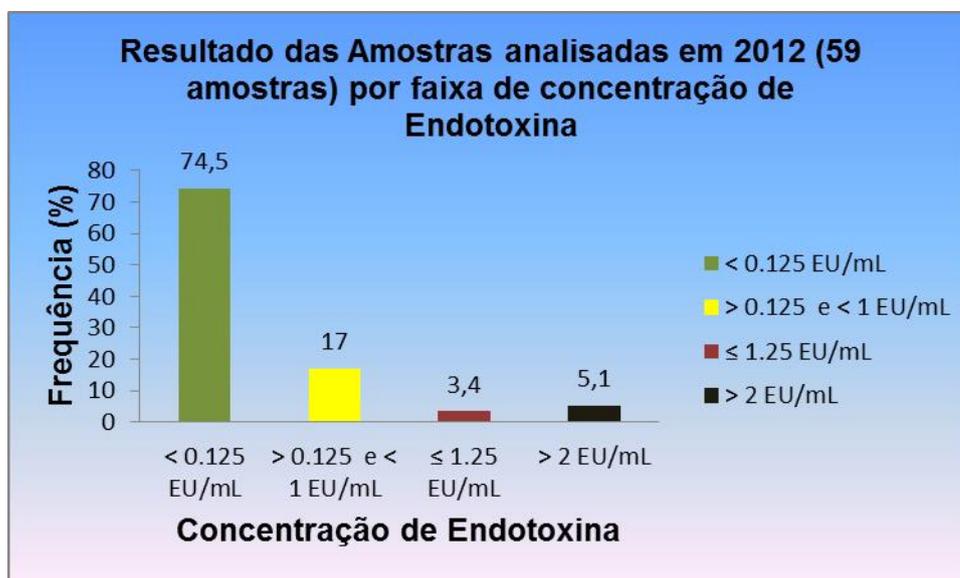
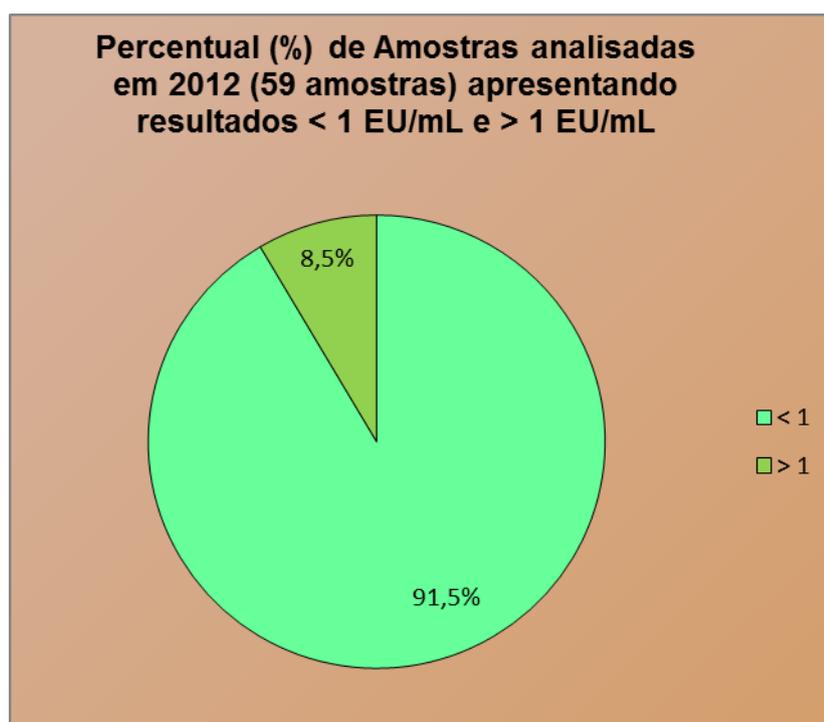


Figura 22. Percentual de amostras analisadas em 2012 com resultados variando entre < 1 EU/mL e > 1 EU/mL.



Com o presente estudo podemos observar que as amostras coletadas e armazenadas em geladeira em ambos os pontos de coleta, sala de Reuso e Pós osmose, mantiveram-se satisfatórias em todos os períodos de análise (24 horas, 7 dias e 14 dias). Em relação às amostras coletadas e armazenadas à temperatura ambiente, podemos observar a insatisfatoriedade a partir das análises de 7 e 14 dias.

6. CONCLUSÃO

- 1- Os resultados obtidos em amostras armazenadas em geladeira no período de 24 horas, 7 dias e 14 dias em ambos os pontos de coleta (Reuso e Pós osmose) demonstraram que a armazenagem em geladeira por um período de até 14 dias não alteraram as concentrações de endotoxina, deste modo, garantindo os resultados das análises.
- 2- Os resultados obtidos em amostras armazenadas à temperatura ambiente no período de 24 horas, 7 dias e 14 dias em ambos os pontos de coleta (Reuso e Pós osmose) demonstraram que a armazenagem em até 24 horas no ponto de Pós osmose e reuso não alteraram as concentrações de endotoxina, deste modo, garantindo os resultados das análises. No período de 7 e 14 dias em ambos os pontos, já ocorre comprometimento dos resultados, sendo estatisticamente significativo. Conclui-se portanto, que até 24 horas de armazenamento à temperatura ambiente não existe comprometimento dos resultados. Apesar da RDC nº 154/2006 mencionar que a água para hemodiálise, “quando imprescindível”, pode ser armazenada, a própria RDC não determina o tempo que essa água pode permanecer armazenada. Nosso estudo sugere que esse procedimento de armazenagem poderá comprometer a qualidade da água.
- 3- Com o presente estudo, podemos concluir que o procedimento de coleta de amostras utilizado atualmente, como descrito nesse trabalho, pode ser mantido.
- 4- Com um percentual de 91,5% de amostras analisadas com resultados de concentrações de endotoxina ≤ 1 EU/mL, sugerimos que a concentração limite de endotoxina preconizada pela RDC/2006 de ≤ 2 EU/mL seja reduzida para ≤ 1 EU/mL, de acordo com a Farmacopeia Americana, USP 2012.

REFERÊNCIAS

ABREU, P.F Propostas para elaboração de uma regulamentação técnica para os procedimentos dialíticos realizados, fora dos serviços de diálise, em pacientes com insuficiências renal aguda ou com insuficiência renal crônica. **Sociedade Brasileira de Nefrologia; Sociedade Brasileira de Enfermagem em Nefrologia**, 2005. Disponível em: <http://www.soben.com.br/publica/Relatorio_Final.doc> [Acesso em 02 de abril de 2011].

ALIANDRO, S. A.; PASCUET, N. S. Qualidade da água de hemodiálise. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 2, n. 18, 2005. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa18_dial.htm> [Acesso em 10 de março de 2011].

ANTISSEPSIS E ANTISSEPTICOS Disponível em <http://www.phmb.info/antissepsia_e_antissepticos.html> [Acesso em 17 de maio de 2011]

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Guia para utilização da norma NBR 5426 – Planos de amostragem e procedimentos na inspeção por atributos**. Rio de Janeiro: 1985. 26p. (NBR 5426).

ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED. **LAL workshop manual**, 2004.

BRASIL. Portaria nº 2042 de 11 de Outubro de 1996. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Terapia Renal substitutiva e as normas para cadastramento desses estabelecimentos junto ao Sistema Único de Saúde. **[Diário Oficial da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DOU nº 199 de 14 outubro de 1996.

BRASIL. Portaria nº 82 de 03/01/2000. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos serviços de diálise e as normas para o cadastramento destes junto ao Sistema Único de Saúde. **[Diário Oficial da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 08 de fevereiro de 2000.

BRASIL. Resolução RDC nº 8, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico que institui as Boas Práticas de Fabricação do Concentrado Polieletrólitos para Hemodiálise – CPHD. **[Diário Oficial da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Resolução-RDC/ANVISA n.º154, de 15 de junho de 2004. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DOU de 17 de junho de 2004, seção 1, p. 65. n.º 115 (república em 2006)

CAMBREX Bio Science Walkersville, Inc. **Catálogo PN204**, 2004.

CHAVES, L. P., ANSEMI, M. L., BARBEIRA, C B S., HAYASHIDA, M. Estudo da sobrevivência de pacientes submetidos à hemodiálise e estimativa de gastos no município de Ribeirão Preto-SP. **Revista Escola de Enfermagem USP**, v. 36, n.2, p. 193-199,2002.

COELHO, S. N. A água de Caruaru. **Revista Virtual de Medicina**, v.1, n. 3, jul., 1998.

Disponível em < <http://www.medonline.com.br>.> [Acesso em 06 de abril de 2011].

COIMBRA, I. K. S.; HIGASKINO, C. E.; SANTOS, E. J.; YAMADA, M.P.A.; CORREA, Q. B. Instituto de Tecnologia do Paraná. **Dossiê Técnico - Qualidade da água de hemodiálise**. p. 1-26, 2007.

DESPIROGENIZAÇÃO. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009. seção 10. 4p. (65.3330.001).

ENSAIO para Endotoxina Bacteriana. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2008. seção 4.3. 18p. (65.3330.006).

EUROPEAN Pharmacopoeia 7.0. Strasbourg: Council of Europe, 2011. p. 2135-2136.

FAVERO, M. S.; ALTER, M. J.; BLAND, L. A. A. Dialysis-associated infections and their control. **Hospital Infections**. 3 ed. Little, Brown and Co., Boston/Toronto/London, publisher, chapter 19, p. 375-403, 1992.

FERREIRA, Joana Angélica Barbosa. **Avaliação microbiológica da água utilizada nas unidades de terapia renal substitutiva no estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro. Monografia (Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2006.

GRAPHPAD PRISM – **Análise de tabela de contingência** – qui-quadrado (teste de Fisher), 2011.

HOENICH, N. A.; RONCO, C.; LEVIN, R. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. **Blood Purification**. v. 24, p. 11-18, 2006.

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR ALBERTO ANTUNES. **Universidade Federal de Alagoas**, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **1º Oficina de Vigilância da Água para Hemodiálise: quadro atual e perspectivas**. Rio de Janeiro, 2007.

KAWANISHI, H, *et al*. The new standard of fluids for hemodialysis in Japan. **Blood Purification**, v. 27, Suppl 1, p. 5-10, 2009.

LEME, I. L.; SILVA, V. G. **Recomendações para garantia da qualidade de água tratada para uso em unidades de hemodiálise.** Associação Brasileira de Centros de Diálise e Transplantes, 2003.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Diversidad procariótica: Archea. **Brock Microbiologia de los Microorganismos**, 2003.

MEDICAL BIOGRAPHIES by Dr. Tuoto. Disponível em <<http://www.medbiography.blogspot.com>> [Acesso em 20 de março de 2011].

MASAKANE *et al.*, **Bacteriological water quality in the central dialysis fluid delivery system from the survey of Japanese Society for Dialysis Therapy.** Blood Purification, v. 27, suppl 1, p. 11-6, 2008.

NYSTRAND, R. Official recommendations for quality of fluids in dialysis – the need for standardization. **Journal Renal Care** v. 35, n. 2, p. 74-81, 2009.

PEGORARO, L. A. **Validação de metodologia analítica aplicada ao controle de qualidade de água para hemodiálise para fins de credenciamento junto ao Inmetro.** Projeto Hemotec II, Curitiba: Tecpar, Finep, 2005.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. C. **Tecnologia Farmacêutica.** Processos de despirogenização, 5 ed. Lisboa, 1990.

RAMIRES, S. S. **Água para hemodiálise no Estado do Rio de Janeiro: Uma avaliação dos dados gerados pelo programa de monitoramento da qualidade nos anos 2006-2007.** Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Monografia (Especialização), 2008.

SANTOS, F., BIERNAT, J. C., SANTOS, A. M., SOUZA, M. E., RAUBACH, A., DEMIN, M. S. Desinfecção de máquinas de hemodiálise com ozônio. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 14-18, 2007.

SESSÃO DE HEMODIÁLISE- Disponível em <<http://www.nefro.com.br/imagens/desenho>> [Acesso em 22 de outubro de 2011].

SILVA, A. N. M., MARTINS, C. T. B., FERRABOLI, R., JORGETTI, V., ROMÃO Jr, J. E. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. **Jornal brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 180-188, 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Censo 2011.** Disponível em <<http://www.sbn.org.br>> [Acesso em 27 de Março de 2012].

THE EUROPEAN Pharmacopeia. 6. ed. 2008. 2v. il.

THE UNITED States Pharmacopeia. 33. ed. Rockville, 2010. 1v. il.

THE UNITED States Pharmacopeia 34. National Formulary 30: 2012. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2011. p. 786-787.

THE UNITED States Pharmacopeia 35. National Formulary 30: 2012. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2012. p. 5039-5040.

THOMÉ, F. S., SENGER, M., GARCEZ, C., GARCEZ, J., CHEMELLO, C., MANFRO, R. C. Dialysis water treated by reverse osmosis decreases the levels of C-reactive protein in uremic patients. **Braslian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.5, p.789-794, 2005.

TODAR, K. Mechanisms of Bacterial Pathogenecity: Endotoxins. In: TEXTBOOK of Bacteriology. Wisconsin, 2008.

TUOTO. E. C. **Biografias médicas.** Disponível em: <<http://www.medbiography.blogspot.com.br/htm>>. Acesso em: 15 novembro 2011.