

Influência do erro de micropipetas na dosagem espectrofotométrica do ensaio de endotoxina bacteriana (LAL cromogênico) aplicável a produtos sujeitos à Vigilância Sanitária

Effect of micropipette inaccuracy on performance of spectrophotometric assay for bacteria endotoxin dosage (chromogenic LAL) employed in products subjected to sanitary surveillance

RIALA6/1387

Ana Paula Mello LEMGRUBER, Octavio Augusto França PRESGRAVE, Rosaura de Farias PRESGRAVE, Eloisa Nunes ALVES, Ronald Santos SILVA, Izabela GIMENES, João Carlos Borges Rolim de FREITAS, Cristiane CALDEIRA*

*Endereço para correspondência: Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4.362, Mangueiras, CEP: 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, e-mail: cristiane.caldeira@incqs.fiocruz.br
Recebido: 29.10.2010 - Aceito para publicação: 02.08.2011

RESUMO

Segundo a norma ISO 17.025, os instrumentos usados em experimento devem ser calibrados. No caso de micropipetas não há limite máximo de erro definido, sendo difícil estipular até que ponto uma micropipeta pode continuar a ser usada. O objetivo do trabalho foi o de determinar a porcentagem de erro no volume da micropipeta que não interfira nos resultados das diferentes etapas do ensaio toxicológico Lisado de Amebócitos de *Limulus* (LAL). Os percentuais de erro foram obtidos do levantamento de 44 certificados de micropipetas. Foram utilizados uma pipeta monocalibrada, de volume variável e *kit* LAL Cromogênio QCL-1000 (Lonza). A curva de endotoxina foi construída com as concentrações de 0,1; 0,25; 0,5 e 1 UE/mL. Os percentuais de erro de $\pm 2\%$, $\pm 4\%$ e $\pm 10\%$ foram comparados com a concentração de referência (0,5 UE/mL), e analisados pelo Student t-test ($p < 0,05$). A análise estatística mostrou que, para a endotoxina padrão e para o substrato do LAL, erro acima de 2% interfere nos resultados, cuja correção deve ser feita pelo ajuste do volume na pipeta. Nenhum erro testado causou interferência estatisticamente significativa na reação da cor do substrato. Micropipetas com erro superior a $\pm 2\%$ devem ser corrigidas.

Palavras-chave. ISO 17.025, incerteza de medição, teste de LAL, erros em micropipetas.

ABSTRACT

The ISO 17025 Guidelines states that all instruments used in performing experiments must be calibrated. For micropipettes no maximum error limit has established, which makes difficult to determine as far as a micropipette can be used without interfering on the final results. The aim of this study was to determine the percentage of errors which could be accepted in the micropipettes volume without interfering on results from different steps of LAL toxicological assay. The error percentages were determined based on the information from 44 certificates of micropipettes survey. A monochannel variable volume calibrated micropipette (Eppendorf) and QCL Chromogenic LAL kit (Lonza) were employed. Endotoxin curve was plotted using 0.1, 0.25, 0.5 and 1 EU/mL concentrations. The error percentages of $\pm 2\%$, $\pm 4\%$ and $\pm 10\%$ were compared with the reference concentration (0.5 EU/mL). Results were analyzed by Student's t-Test in relation to the reference concentration ($p < 0.05$). Statistical analysis showed that the error of 2% did not interfere on standard endotoxin and LAL substrate results, but errors above this percentage caused alterations on results. Micropipette errors did not interfere on the reaction of substrate color. Errors higher than $\pm 2\%$ should be corrected by adjusting the micropipette volume.

Keywords. ISO 17025, measurement unsureness, LAL test, micropipette error.

INTRODUÇÃO

Todos os produtos injetáveis de uso humano que se encontram no mercado devem ser livres de pirogênio. A contaminação desses produtos é considerada um grave problema de saúde pública, porque pode causar febre ou alterações vasculares que podem levar o paciente ao óbito¹. A legislação nacional preconiza como testes de segurança para a detecção de pirogênios o teste em coelhos e o Teste de Endotoxina Bacteriana, também conhecido como Lisado de Amébocito de *Limulus* (LAL)^{2,3}.

Internacionalmente o processo de padronização das atividades dos laboratórios de ensaio e calibração teve início com a publicação da ISO/IEC Guia 25 em 1978, com exceção da Europa em que vigorava a EM 45001⁴.

Para suprir algumas lacunas não contempladas nas normas anteriores, como por exemplo, a rastreabilidade de medições e o uso de meios eletrônicos, a ISO iniciou em 1995 os trabalhos de revisão do Guia 25, do qual resultou a norma ISO/IEC 17025:1999, publicada em 2000. Essa norma cancelou e substituiu o Guia 25 e a EM 45.001 de modo a harmonizar o conteúdo com textos idênticos em nível internacional e regional, além de haver uma convergência completa com os requisitos das ISO 9001 e 9002. No Brasil, foi publicada pela ABNT como NBR ISO/IEC 17.025:2001, tendo sua última revisão em 2005 com o objetivo de alinhar a ISO/IEC 17.025 à nova ISO 9001:2000⁴.

A ISO 17.025:2005 “Requisitos Gerais para a Competência dos Laboratórios de Testes e Calibração” é um padrão internacional que indica que os laboratórios de testes e de calibração operam um sistema de qualidade e são tecnicamente capacitados⁴.

O credenciamento na norma demonstra oficialmente que os resultados dos testes e da calibração são tecnicamente válidos e, portanto, todo material usado em experimento que envolva unidades de medida deve estar calibrado, de forma a garantir a qualidade dos resultados obtidos⁵.

As micropipetas são instrumentos volumétricos utilizados para a medição de um determinado volume de líquido quando são necessários valores na ordem dos microlitros. São instrumentos de medição muito importantes em áreas como a química, biologia, saúde, farmácia e genética, que trabalham com o doseamento volumétrico em pequena escala.

A ISO 17.025:2005 no seu item 5.10 define que o resultado das calibrações realizadas pelo laboratório deve ser relatado com exatidão, clareza e objetividade

na forma de um relatório ou certificado de calibração. Esses certificados devem incluir as condições que possam ter influência nos resultados da medição, a incerteza e evidência de que as medições são rastreáveis. Dessa forma, as micropipetas utilizadas nas diluições e demais dosagens são calibradas pelos Laboratórios da Rede Brasileira de Calibração (RBC), os quais fornecem um certificado em que constam os erros para cada volume medido. Esse erro é sistemático e definido como sendo a diferença entre o valor medido e o valor nominal⁵.

A calibração de micropipetas é de grande importância para os testes analíticos, uma vez que permite verificar os erros e incertezas associados ao material utilizado de modo a ajustar o volume mais exato possível. No entanto, em algumas situações, esses erros são demasiadamente altos. Uma vez que não existe um parâmetro definido que fixe um limite máximo de erro, fica muito difícil para o experimentador avaliar até que ponto a micropipeta pode continuar a ser usada sem interferir no experimento.

Muitos ensaios biológicos são baseados na detecção de substâncias, cuja quantificação precisa ser confiável. Considerando a dificuldade em se estabelecer a incerteza desse tipo de ensaio, é necessário diminuir ao máximo os fatores que possam interferir nessa incerteza, entre eles, os decorrentes de erros das micropipetas utilizadas nas diversas etapas do ensaio^{6,7}.

O teste de endotoxina bacteriana (método cromogênico) é um ensaio toxicológico quantitativo utilizado para a detecção de endotoxinas de bactéria Gram-negativa. Esse método utiliza o Lisado de Amébocitos de *Limulus* (LAL) modificado e um substrato produtor de cor sintética para detectar endotoxinas. Por esse método, uma amostra é misturada com o LAL, incubada e interrompida com um reagente de parada. Se houver endotoxina, ela apresentará uma coloração amarela determinada por espectrofotometria a 405-410nm. Uma vez que essa absorvência é diretamente proporcional à quantidade de endotoxina presente, a concentração de endotoxina pode ser calculada a partir de uma curva-padrão. Dessa forma, qualquer alteração no volume da amostra ou de um dos reagentes utilizados pode ser considerada como um ponto crítico na confiabilidade dos resultados e gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos.

O presente estudo visa determinar o limite máximo do percentual de erro no volume da micropipeta a ser aceito que não interfira nos resultados das diferentes

etapas do LAL, sugerindo que a partir desse limite, a micropipeta seja considerada imprópria para esse ensaio (ou descartada).

MATERIAL E MÉTODOS

Micropipeta

Durante todos os experimentos, foi utilizada a mesma micropipeta, monocanal, de volume variável (200 a 1000 μ L), Eppendorf, calibrada com certificado emitido por laboratório da Rede Brasileira de Calibração, sem erro significativo nos volumes testados. O volume foi alterado de forma a mimetizar os erros a serem estudados (erro induzido).

Reagentes

Para a determinação dos erros induzidos foi realizada uma curva inicial utilizando o corante Vermelho Neutro (Sigma) e para os experimentos com o Teste de Endotoxina Bacteriana, foi utilizado o *kit* Lisado de Amebócitos de Limulus (LAL Cromogênio QCL-1.000 Lonza).

Escolha dos percentuais de erro

Os percentuais de erro foram obtidos por meio do levantamento em certificados de calibração de 44 micropipetas mono e multicanais do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS.

Curva do Vermelho Neutro

Foi colocada em microtubos solução estoque de Vermelho Neutro (Sigma) a 0,04% cujos volumes continham erros induzidos de $\pm 1\%$, $\pm 2\%$, $\pm 5\%$, $\pm 10\%$ e $\pm 20\%$. Foi adicionada em cada microtubo, água destilada suficiente para completar o volume total de 1 mL. Também foi utilizada uma solução controle em que nenhum percentual de erro foi gerado. Após a diluição, 100 μ L de cada solução foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e a leitura realizada em 540 nm na leitora de microplacas (VersaMax®, Molecular Devices). A curva do Vermelho Neutro foi realizada somente como um estudo piloto, visando verificar a influência do erro na micropipeta, antes de estudar de forma aplicada no Teste de Endotoxina Bacteriana.

Teste de endotoxina bacteriana

O teste foi realizado conforme descrito no *kit*, variando-se o volume das soluções aplicadas em três etapas

distintas do método: endotoxina padrão (Etapa1), substrato do LAL (Etapa 2) e substrato de cor (Etapa 3). A solução de parada não foi alterada em nenhum dos grupos (Quadro 1).

Quadro 1. Esquema de alteração (indução de erro) dos reagentes do kit de LAL cromogênico (QCL-1000, Lonza)

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Padrão	altera	fixo	fixo
Substrato LAL	fixo	altera	fixo
Substrato de cor	fixo	fixo	altera
Sol. Parada	fixo	fixo	fixo

A curva de endotoxina foi construída nas concentrações de 0,1 UE/mL, 0,25 UE/mL, 0,5 UE/mL e 1,0 UE/mL.

A concentração de 0,5 UE/mL foi usada também como referência, representando 100% da presença dos reagentes (erro 0), para a comparação com as soluções em que o erro foi induzido. Nos demais pontos, excetuando-se a curva, os volumes de cada reagente foram alterados, de modo a gerar os erros da micropipeta. Em função da limitação de ajuste do volume da micropipeta, somente os erros induzidos de $\pm 2\%$, $\pm 4\%$ e $\pm 10\%$, além da concentração de referência, foram estudados.

Análise Estatística

Na curva de Vermelho Neutro foram realizados oito poços para cada erro gerado e foram realizadas cinco repetições, enquanto que no teste de endotoxina bacteriana, cada erro induzido foi realizado em somente quatro poços, com três repetições, em função do custo do *kit*. Os resultados foram analisados por meio do teste t-Student não pareado, em planilha MS Excel®, comparando-se cada grupo correspondente ao erro induzido com o grupo controle. Foram consideradas diferenças significativas se o valor-p for menor que 0,05.

RESULTADOS

O levantamento dos certificados de calibração demonstrou que 43 micropipetas apresentavam erros na faixa entre -2% até +3%, sendo que, em um caso, foi encontrado um erro de -10,6%. Diante desses dados, foram selecionados os erros de $\pm 1\%$, $\pm 2\%$, $\pm 4\%$, $\pm 5\%$, $\pm 10\%$ e $\pm 20\%$, procurando abranger não só os percentuais encontrados, bem como erros superiores com a finalidade de verificar os limites de aceitabilidade dos mesmos.

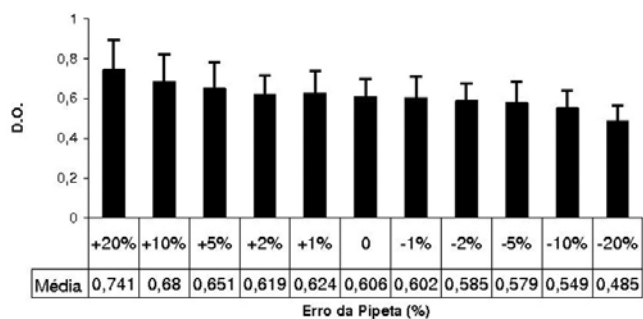


Figura 1. Perfil da curva de Vermelho Neutro em função dos erros induzidos, n=5 (média ± erro padrão)

A curva do Vermelho Neutro mostrou que os erros de +1%, -1% e +2% foram considerados não-significativos em relação ao ponto central (controle), ao passo que os erros de -2%, +5%, -5%, +10%, -10%, +20% e -20%, mostraram ser significativos (Figura 1).

Na Etapa 1 do teste de endotoxinas, na qual variou-se o volume do padrão de endotoxina, o perfil da curva mostrou-se coerente com o erro induzido, apresentando uma relação dependente entre a quantidade de endotoxina maior ou menor, em comparação com a concentração de referência, ou seja, com 0% de erro (Figura 2).

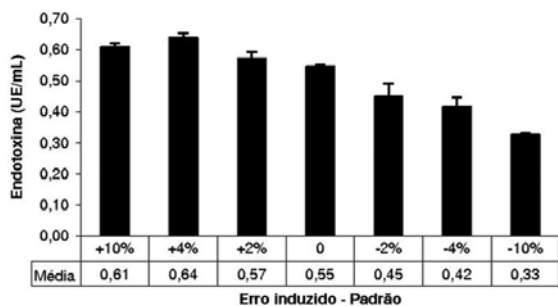


Figura 2. Resultado do teste de LAL, simulando diferentes erros quando da aplicação do padrão de endotoxina, n=3 (média ± erro padrão)

A análise estatística mostrou que erros até ±2% não alteraram o resultado, enquanto que os erros de ±4% e ±10% apresentaram diferença significativa (Tabela 1).

Na Etapa 2, na qual o erro foi induzido na adição do substrato LAL, os valores de recuperação da endotoxina em relação à concentração de referência também demonstraram diferenças significativas com os erros de ±4% e ±10% (Figura 3).

Tabela 1. Valores de p obtidos no teste t-Student para cada erro no Teste de LAL, n=3

	Padrão	Subst. LAL	Subst. Cor
10%	0,00218**	0,00304**	0,08996+
+4%	0,00028**	0,00637**	0,06644+
+2%	0,30011+	0,14204+	0,07013+
0	-	-	-
-2%	0,06041+	0,17291+	0,92959+
-4%	0,00396**	0,04739*	0,37989+
-10%	4,885x10 ⁻⁷ **	0,01825*	0,99721+

+ Não significativo; * significativo $\alpha=0,05$; **significativo $\alpha=0,01$

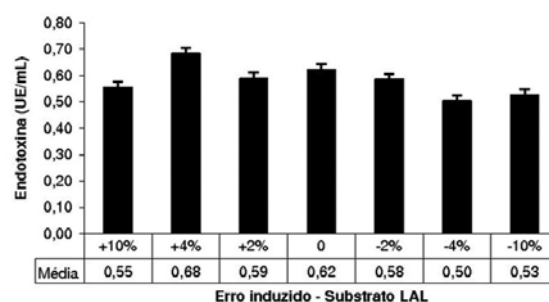


Figura 3. Resultado do teste de LAL, simulando diferentes erros quando da aplicação do substrato de LAL, n=3 (média ± erro padrão)

Foi encontrada uma redução na dosagem de endotoxina para o erro induzido de +10% nas Etapas 1 e 2. Tal fato precisará ser melhor investigado, uma vez que esperava-se um valor igual ou superior ao encontrado para o erro de 4%. A análise estatística mostrou que erros até ±2% não alteraram o resultado, enquanto que os erros de ±4% e ±10% apresentaram diferença significativa (Tabela 1).

Na Etapa 3, em que induziu-se o erro no substrato de cor, a resposta da quantificação de endotoxinas permaneceu inalterada, demonstrando que erros até ±10% não interferem nesse reagente do kit. Não houve, portanto, diferença significativa entre os valores encontrados com os erros induzidos, quando comparado com a concentração de referência.

DISCUSSÃO

O erro nos volumes pipetados é uma importante fonte de incerteza e, por isso deve ser considerado nos resultados das análises.

A correção do erro em micropipetas nem sempre é possível de ser realizada pelo técnico no momento

do ensaio. As de volume fixo, como o nome já diz, não permitem variar o volume e nas multicanais, qualquer ajuste feito incidirá sobre todos os canais e não apenas naquele que apresentou a variação. Nesse caso, as opções seriam a de não utilizar o canal que apresenta um erro maior que 2%. No caso de micropipetas monocanais de volume variável a correção pode ser realizada por meio da alteração do volume para mais ou para menos, conforme indicação do erro no certificado.

Cabe ressaltar, que os resultados alcançados neste estudo estão relacionados aos ensaios e condições avaliados e devem ser realizados para cada tipo de análise. Deve ser levada em consideração, portanto, uma possível variação significativa em uma ou mais etapas, ou, até mesmo, um problema do erro cumulativo ao longo das diferentes etapas de uma dosagem.

Em todas as repetições realizadas alterando o volume da endotoxina e do substrato LAL, a indução do erro de +10% resultou em valor abaixo do padrão, o que não condiz com o esperado. Isso pode significar que a disponibilidade aumentada de cada um desses reagentes na reação iniba de algum modo a formação do complexo reativo quantificado na absorvência. Outros estudos devem ser conduzidos sobre a ligação endotoxina/substrato LAL para verificar a real influência do erro da micropipeta nesse parâmetro.

Uma possível justificativa para que a influência do erro não tenha sido significativa para o substrato de cor pode residir no fato de que a quantidade desse substrato na solução tenha sido suficiente para se acoplar a qualquer quantidade do complexo endotoxina/LAL.

CONCLUSÃO

No teste do LAL, o erro da micropipeta interferiu quando foram alterados os volumes do padrão de endotoxina (que na prática laboratorial representa a amostra-teste) e do substrato de LAL. Isso pode ser explicado pelo fato de que o desfecho avaliado pela absorvência é a quantificação do complexo reativo formado pela ligação direta da endotoxina com o substrato. Desse modo, a quantidade deste complexo é diretamente proporcional à quantidade maior ou menor desses reagentes disponíveis na reação. A redução na dosagem de endotoxina observada no erro de +10% quando da alteração da solução de referência e do substrato do LAL precisa ser melhor investigada.

Erros superiores a $\pm 2\%$ devem ser corrigidos. Essa correção deverá ser realizada por meio da alteração do volume ajustado na micropipeta monocanal de volume variável, por ocasião da realização dos ensaios estudados. Micropipetas monocanais de volume fixo e multicanais que apresentarem um percentual de erro superior a $\pm 2\%$ não devem ser utilizadas no ensaio. A não correção dos erros pode alterar os resultados de ensaios analíticos, comprometendo a confiabilidade dos mesmos.

Os resultados encontrados limitam-se à aplicação para o teste de endotoxina bacteriana (teste de LAL), devendo ser efetuado estudo semelhante para cada teste ou ensaio específico, com a finalidade de se verificar a influência ou não do erro das micropipetas.

REFERÊNCIAS

1. 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;26:265-77.
2. Farmacopeia Brasileira. 4ª ed. Parte II. Fascículo 5. São Paulo: Atheneu; 2003. Teste de Pirogênio. v.5.1.2.
3. Farmacopeia Brasileira. 4ª ed. Parte II. Fascículo 1. São Paulo: Atheneu; 1996. Endotoxinas Bacterianas; v.5.1.9.
4. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR ISO/IEC 17025: 2005. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT); 2005.
5. Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde - INCQS (BR). Métodos de Ensaio e Calibração e Validação de Métodos do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); 2009.
6. Morel P, Arruda TL, Bohrer-Morel MBC. Calculation of uncertainties in influence quantities in biological essays. *Braz Arch Biol Technol*. 2006;49:97-9.
7. Lourenço FR, Kaneko TM, Pinto TJA. Estimativa da incerteza em ensaio de detecção de endotoxina bacteriana pelo método de gelificação. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2005;41(4):437-43.