

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

Fernando Faria Fingola

**VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE ENDOTOXINA BACTERIANA (LAL) PARA O SORO
ANTIBOTRÓPICO PELO
MÉTODO CROMOGÊNICO CINÉTICO**

Rio de Janeiro

2011

Fernando Faria Fingola

**VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE ENDOTOXINA BACTERIANA (LAL) PARA O SORO
ANTIBOTRÓPICO PELO
MÉTODO CROMOGÊNICO CINÉTICO**

Mestrado Profissional

Programa de Pós-Graduação em Vigilância
Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em
Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora:

Dra. Helena Pereira da Silva Zamith

Rio de Janeiro

2011

Fingola, Fernando Faria

Validação do ensaio de endotoxina bacteriana (LAL) para o soro antibotrópico pelo método cromogênico cinético / Fernando Faria Fingola. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011.

79 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2011.

Orientadora: Helena Pereira da Silva Zamith

1. Endotoxina. 2. LPS. 3. Cromogênico cinético. 4. Ensaio de endotoxina bacteriana (LAL). 5. Validação de metodologia. I.Título.

Validation of bacterial endotoxin test (LAL) for the antitoxin serum by kinetic chromogenic method.

Fernando Faria Fingola

**VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE ENDOTOXINA BACTERIANA (LAL) PARA O SORO
ANTIBOTRÓPICO PELO MÉTODO CROMOGÊNICO CINÉTICO.**

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em 26 / 08 / 2011.

Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado (USP)

Dr. Wlamir Correa de Moura (FIOCRUZ)

Dra. Helena Pereira da Silva Zamith (FIOCRUZ) - Orientadora

Rio de Janeiro

2011

Dedico este trabalho:

À Deus.

Aos meus pais, Florival e Isaura (*in memoriam*).

Aos meus filhos Caio e Yasmin.

À minha esposa Sheila.

À minha família.

DEUS !

Eu agradeço por me lembrar do poder que possuo

Agradeço por me mostrar que sou protegido, guiado e iluminado pela sua presença divina no mais íntimo do meu ser.

Agradeço, Senhor, por me dar abrigo na tempestade, por endireitar o que está errado, por criar saídas onde parece não haver escapatória.

Agradeço por me perdoar quando eu não posso ou não quero perdoar a mim ou aos meus semelhantes

Agradeço, Senhor, pela sua compaixão, pela sua graça, pela sua bondade, que estão sempre presentes, sustentando-me nos momentos mais difíceis.

Agradeço, Senhor, por não me deixar esquecer que Você me habita e é a força que dá vida à minha alma.

Agradeço, Senhor, pelo ser humano que sou.

AGRADECIMENTOS

- Ao INCQS pela realização deste estudo.
 - A meus pais Florival Fingola e Isaura Faria Fingola (*in memoriam*), por fazerem de mim um “ser humano do bem”.
 - Aos meus filhos Caio e Yasmin, presentes de Deus na minha vida.
 - À responsável pelo laboratório de Endotoxina Bacteriana (LAL) (INCQS/FIOCRUZ), Sheila Regina Gomes Albertino, minha esposa, pela cumplicidade, ajuda e incentivo em todos os momentos deste trabalho e da minha vida.
 - À minha família, em especial à minha querida tia Yolanda Faria Brum, minha irmã Flávia Fingola da Silva Valle e meu cunhado Paulo Antônio da Silva Valle.
 - A todos os amigos do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT), INCQS/ FIOCRUZ,
 - À Dra. Helena Pereira da Silva Zamith, Chefe do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (INCQS/FIOCRUZ), pela sua paciência, dedicação ao trabalho e pelo seu grande profissionalismo na orientação deste estudo.
 - Ao Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado, Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), um grande mestre, incentivador e amigo.
 - Aos amigos Gilmar Rocha e Patrícia Martins (CAMBREX®), pela inestimável ajuda e companheirismo na realização deste trabalho.
- À DEUS, por me permitir mais uma vitória.

RESUMO

A busca por novas metodologias visando a substituição de métodos *in vivo* por métodos *in vitro*, vem ao longo dos anos se tornando um grande desafio cada vez maior entre pesquisadores e cientistas, em particular na área de controle de qualidade de produtos sujeitos à Vigilância Sanitária. No que se refere ao controle de qualidade de soros antiofídicos, o único ensaio preconizado pelas Farmacopéias oficiais para a detecção de contaminantes pirogênicos é o teste de pirogênio realizado em coelhos. Em nosso trabalho, dentre os diversos soros antiofídicos produzidos no Brasil, propusemos a validação da determinação de endotoxina no soro antibotrópico pelo método Quantitativo Cromogênico em *Limulus* (QCL-cinético). O ensaio de endotoxina bacteriana (LAL) pelo método QCL-cinético é específico para detecção de endotoxina de bactérias Gram negativas. A escolha do soro antibotrópico se deveu ao fato de ser a serpente do gênero *Bothrops* a maior causadora de acidentes ofídicos em nosso país e conseqüentemente o soro com maior freqüência de análises no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) para controle de sua qualidade. A validação do ensaio envolveu a determinação de parâmetros de desempenho exigidos pela ANVISA, FDA e USP. O coeficiente de correlação (r) da curva-padrão de endotoxina (*E. coli* 055: B5 Endotoxin), de 0.005 EU/mL a 50 EU/mL, em todos os experimentos, ficou entre -0,998 e -1,000; a recuperação da endotoxina adicionada à amostra (0,5 EU/mL) na diluição de trabalho (1:10) em todos os experimentos obedeceu ao critério de recuperação, ou seja, entre 50 a 200%. O coeficiente de variação (C.V. <15%) no parâmetro de precisão nas 6 determinações foi de 12,6%; 5,6%; 9,6%; 13,8%; 9,9% e 11,4%. A exatidão (80 a 120%) nas 6 determinações apresentou os seguintes resultados: 103,1%; 103,1%, 110,5%; 114,3%; 103,7% e 90,7%. A concentração Limite de Endotoxina (CLE) para o soro antibotrópico a partir da validação passa a ser $\leq 2,9$ EU/mL. A metodologia foi considerada validada intralaboratorialmente após o cumprimento dos parâmetros de desempenho.

ABSTRACT

The search for new methodologies aiming at the replacement of *in vivo* methods by *in vitro* ones has become a great challenge for researchers and scientists all over the years, in particular in the quality control area of products subject to the regulations of Public Health. As to the quality control of antiophidic serums, the pyrogenicity test in rabbits is the only assay stipulated by the official pharmacopoeias for the quality control of snake venom antiserum preparations to detect pyrogenic contaminants. Among the several types of snake venom antisera produced in Brazil, this work proposes to validate the determination of endotoxin for the antitropic serum by the *in vitro* *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) test by Kinetic-QCL method. The Kinetic-QCL LAL testing is a quantitative, kinetic and specific assay for the detection of Gram negative bacterial endotoxin. The reason for choosing the antitropic serum was that snakes of the *Bothrops* genus are responsible for the highest ophidic accidents in Brazil. Therefore, the antitropic serum shows the highest analysis frequency for quality control at the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) from FIOCRUZ. The validation assay involved the determination of the performance parameters required by Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Food and Drug Administration (FDA) and the United States Pharmacopoeia (USP). The absolute value of the correlation coefficient (r) of the calculated standard curve with endotoxin preparation (*E. coli* 055: B5 Endotoxin), from 0.005 EU/mL to 50 EU/mL in all experiments, in the sample dilution 1/10 performed, was in the acceptable range of -0,998 e -1,000. The percentage of endotoxin recovered, which was added (0.5 EU/mL) to the sample (antitropic serum) obeyed the criteria of recuperation within 50 - 200%. The coefficient of variation (C.V.) in the precision parameter in six determinations was 12.6%; 5.6%; 9.6%; 13.8%; 9.9% e 11.4%, less than 15%. The accuracy (80 to 120%) calculated in six determinations showed the following results: 103.1%; 103.1%, 110.5%; 114.3%; 103.7% e 90.7%, within the range of 80 to 120%. After the validation, the concentration limit of endotoxin (CLE) for the antitropic serum was established as ≤ 2.9 EU/mL. The Kinetic-QCL LAL test was considered validated to detect endotoxin in antitropic serum because of the accomplishment of all required parameters.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT-	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AG-	Ácidos graxos
ALT-	Alanina transaminase
ANVISA-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ca-	Cálcio
CLE-	Concentração limite de endotoxina
CPK-	Creatinofosfoquinase
CPP-	Controle positivo do padrão
CSE-	Controle padrão de endotoxina
C.V.-	Coeficiente de Variação
EDTA-	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA-	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EU-	Unidades de Endotoxina
FDA-	Food and Drug Administration
FIOCRUZ-	Fundação Oswaldo Cruz
FUNED-	Fundação Ezequiel Dias
INCQS-	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO-	Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial
IEC-	International Electrotechnical Commission
ISO-	Internacional Organization for Standardization
KDO-	Ácido 2-ceto-3-dexooctanóico
LAL-	Lisado do amebócito do limulus
LDH-	Desidrogenase láctica
LPS-	Lipopolissacarídeo
MDV-	Máxima diluição válida
Mg-	Magnésio
mm-	milímetros
NAG-	N-acetilglicosamina
NBR-	Norma Brasileira
Nm-	Nanômetros
OMS-	Organização Mundial da Saúde

pH-	Potencial de hidrogênio
pNA-	para-Nitroanilina
PNI-	Programa Nacional de Imunização
PO ₄ -	Fosfato
POP-	Procedimento Operacional Padronizado
QCL-	Quantitativo Cromogênico em <i>Limulus</i>
SER-	Padrão de referência de endotoxina
SAAc-	Soro anti-aracnídico
SAB-	Soro antibotrópico
SABC-	Soro antibotrópico-crotálico
SABLC-	Soro antibotrópico-laquéutico-crotálico
SABL-	Soro antibotrópico-laquéutico
SAC-	Soro anticrotálico
SAD-	Soro antidiftérico
SAEL-	Soro anti-elapídico
SAE-	Soro anti-escorpiônico
SAL-	Soro antilaquéutico
SALon-	Soro antilonômico
SALox-	Soro antiloxoscélico
SAR--	Soro antirrábico
SAT-	Soro antitetânico
SINITOX-	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
TC-	Tempo de coagulação
PTT-	Tempo Parcial de Tromboplastina
USP-	United States Pharmacopeia
WinKQCL-	Software do Limulus Cromogênico Cinético Quantitativo

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Acidente causado por serpentes do gênero Bothrops.	22
Quadro 2- Acidente causado por serpentes do gênero Bothrops.	23
Quadro 3- Classificação do acidente botrópico quanto à gravidade e a dose recomendada.	25
Quadro 4- Classificação do acidente crotálico quanto à gravidade e a dose recomendada	28
Quadro 5- Orientação para o tratamento do acidente laquétrico quanto à gravidade e a dose recomendada.	30
Quadro 6- Orientação para o tratamento do acidente elapídico quanto à gravidade e a dose recomendada.	31
Quadro 7- Pirogênios endógenos e exógenos de origem microbiana e não microbiana..	38
Quadro 8- Vantagens e Desvantagens do Ensaio de LAL X Ensaio de Pirogênio.	45
Quadro 9- Classificação dos testes, segundo sua finalidade (ANVISA).	51
Quadro 10- Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.	52
Quadro 11- Parâmetros e Especificações da Curva padrão.	54
Quadro 12- Resultados da Curva padrão.	64
Quadro 13- Resultados dos Ensaios de LAL (método cromogênico cinético) e Teste de Pirogênio em amostras de soro antibotrópico (SAB).	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processamento do plasma para obtenção de Soro.	34
Figura 2. Esquema da parede celular de bactéria Gram negativa.	41
Figura 3. Frequência de análises de pirogênio realizadas pelo INCQS nos diferentes soros hiperimunes no período de 2000 a 2010.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Ensaio de Qualificação Inicial:Curva padrão de endotoxina bacteriana.	64
Tabela 2- Ensaio de Inibição/Potencialização. Produtor 01: lote n°0907144/C.	65
Tabela 3- Ensaio de Inibição/Potencialização. Produtor 02: lote n°095112 B.	66
Tabela 4- Ensaio de Inibição/Potencialização. Produtor 03: lote n°08061024 A.	66
Tabela 5- Validação do LAL - método cromogênico cinético: Especificidade/ Seletividade.	67
Tabela 6- Validação do LAL - método cromogênico cinético: Linearidade/Curva padrão.	67
Tabela 7- Validação do LAL- método cromogênico cinético: Repetitividade.	68
Tabela 8- Validação do LAL-método cromogênico cinético: Precisão (Analista 01: Soro antibotrópico lote n° 0905101/B).	69
Tabela 9- Parâmetros da Curva padrão - Precisão (Analista 01).	69
Tabela 10- Validação do LAL- método cromogênico cinético: Precisão (Analista 02: Soro antibotrópico lote n° 0905101/B).	70
Tabela 11- Parâmetros da Curva padrão - Precisão (Analista 02).	70
Tabela 12- Validação do LAL- método cromogênico cinético: Exatidão - Soro antibotrópico Lote n° 0905101/B.	71
Tabela 13- Parâmetros da Curva padrão - Exatidão.	72

Tabela 14- Validação do LAL- método cromogênico cinético: Exatidão - Soro antibotrópico Lote n° 0905101/B.	72
Tabela 15- Parâmetros da Curva padrão - Exatidão.	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Ofidismo	18
1.2 Características das Serpentes	19
1.3 Aspectos Epidemiológicos	20
1.4 Acidente Botrópico	20
1.4.1 Diagnóstico	24
1.4.2 Tratamento	24
1.5 Acidente Crotálico	26
1.5.1 Diagnóstico	26
1.5.2 Tratamento	27
1.6 Acidente Laquético	29
1.6.1 Diagnóstico	29
1.6.2 Tratamento	29
1.7 Acidente Elapídico	30
1.7.1 Diagnóstico	31
1.7.2 Tratamento	31
1.8 Soros Antiofídicos	32
1.8.1 Produção de Soros	32
1.9 Soro Antibotrópico	34
1.9.1 Composição do Soro Antibotrópico	35
1.10 Controle de Qualidade	35
1.11 Pirogênio: (Histórico)	35
1.11.1 Classificação dos pirogênios	37
1.12 Endotoxinas	39
1.12.1 Natureza química da endotoxina	39
1.12.2 Composição química das regiões do LPS	40
1.12.3 Lipídeo A e virulência	40
1.13 Métodos Alternativos	41
1.13.1 Razões para a Substituição do Ensaio de Pirogênio pelo Ensaio LAL.	43
1.14 Princípio do ensaio de Endotoxina Bacteriana (LAL)	46

1.14.1 Ensaio de LAL - QCL-Cinético	46
1.14.1.1 Linearidade	47
1.14.1.2 Repetitividade	48
1.14.1.3 Tipos de ensaios do LAL (método QCL – cinético)	48
1.14.1.4 Interferentes	49
1.15 Validação de métodos	49
1.15.1 Parâmetros de desempenho de validação	50
1.15.2 Protocolo de Validação	52
1.15.2.1 Qualificação Inicial	53
1.15.2.2 Ensaio de Inibição/Potencialização	53
1.15.2.3 Seletividade	53
1.15.2.4 Linearidade/Curva padrão	53
1.15.2.5 Precisão	54
1.15.2.5a Repetitividade (precisão intra-corridas)	54
1.15.2.5b Precisão intermediária (precisão inter-corridas)	55
1.15.2.7 Exatidão	55
2 JUSTIFICATIVA	56
3 OBJETIVOS	58
3.1 Objetivo geral	58
3.2 Objetivos específicos	58
4 METODOLOGIA	59
4.1 Estudo de Validação	59
4.2 Procedimento experimental do ensaio LAL (método QCL-Cinético)	60
4.3 Ensaio de Pirogênio	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÃO	75
7 PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ofidismo

Ofidismo é o envenenamento provocado pela ação de toxinas inoculadas através do aparelho inoculador (presas) de serpentes, podendo determinar alterações locais (na região da picada) e sistêmicas. Como consequência da absorção do veneno na circulação sanguínea, os mecanismos de ação específicos determinam manifestações clínicas diferenciadas para cada gênero de serpente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Existem no mundo aproximadamente 3000 espécies de serpentes, das quais de 10 a 14% são consideradas peçonhentas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que ocorram no mundo 1.250.000 a 1.665.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, com 30.000 a 40.000 mortes. A mortalidade dos acidentados varia nas diferentes regiões do mundo. Na Ásia, principalmente na Índia, Paquistão e Birmânia, os acidentes ofídicos provocam de 25 mil a 35 mil óbitos por ano, sendo uma das serpentes mais importantes a *Vipera russeli*. Na Nigéria, ocorrem 500 casos por 100 mil habitantes, com taxa de mortalidade de 10%. Nos Estados Unidos, 12 a 15 dos 8 mil casos anuais são fatais, levando a uma mortalidade de 0,2%. Na África, ocorrem de 400 a 1.000 mortes por ano, causadas principalmente pelas serpentes conhecidas como Naja (PINHO; PEREIRA, 2001).

Os acidentes por serpentes são considerados um problema de saúde pública no Brasil há várias décadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). No entanto, passaram a ser um agravo de notificação obrigatória somente a partir do ano de 1986, o que permitiu uma melhor compreensão de sua epidemiologia. Na América do Sul, o Brasil é o país com maior número de acidentes com cerca de 20.000 casos por ano, seguido pelo Peru (4.500), Venezuela (2.500 a 3.000), Colômbia (2.675), Equador (1.200 a 1.400) e Argentina (1.150 a 1.250) (LIMA; CAMPOS; RIBEIRO, 2009).

No Brasil, a maior parte dos acidentes ofídicos são causados por serpentes peçonhentas, principalmente àquelas do gênero *Bothrops*, que representam 73,5% das espécies envolvidas neste tipo de agravo, seguidas pelos gêneros *Crotalus* 7,5%, *Lachesis* 3,0% e *Micrurus* 0,7%, havendo pequenas variações de acordo com as regiões e distribuição geográfica das serpentes. Poucos casos são

diagnosticados como acidentes por serpentes não peçonhentas (3,0%). Por outro lado, 11,8% foram diagnosticados como acidentes por serpentes não identificadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Em relação às serpentes não peçonhentas, existem algumas espécies que são consideradas de importância médica e que poderiam causar um suposto envenenamento sistêmico ou fatal, como é o caso dos gêneros *Phalotris*, *Philodryas*, *Xenodon* e *Tachimenis* (ROJAS et al., 2007).

1.2 Características das Serpentes

As serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* possuem dentes inoculadores bem desenvolvidos e fosseta loreal, um orifício situado entre o olho e a narina, sendo um órgão termorreceptor que indica que a serpente é peçonhenta (por isso são também conhecidas popularmente por "*serpentes de quatro ventas*"). Possuem ainda, pupilas em fenda, cabeça destacada do corpo, a cauda abruptamente afinada, com hábitos noturnos e costumam ser vagarosas. As serpentes do gênero *Micrurus* são uma exceção, pois, apesar de serem peçonhentas, não apresentam fosseta loreal e possuem dentes inoculadores pouco desenvolvidos. No caso das serpentes do gênero botrópico, há uma diferença entre o veneno do filhote, que é predominantemente coagulante, e do adulto, com maior ação proteolítica e menor ação coagulante. As serpentes não peçonhentas não possuem presas anteriores e fosseta loreal, possuem pupilas circulares, cabeça não destacada do corpo, cauda progressivamente afinada, hábitos diurnos e costumam ser ágeis (PINHO; PEREIRA, 2001).

A maioria das serpentes de interesse em saúde pública tem hábito terrícola e noturno. Alimentam-se principalmente de roedores (ratos, camundongos e preás), que geralmente se reproduzem em locais próximos a residências, devido aos depósitos de lixo e entulho e ao armazenamento de grãos. Os acidentes são facilitados pelo comportamento das serpentes peçonhentas de ficarem enrodilhadas, imóveis e camufladas às margens de trilhas, próximas a roças, galpões e bambuzais, em busca de roedores. Também são encontradas nas cercanias de centros urbanos e áreas residenciais próximas a parques, matas, veredas, rios, córregos, lagos e áreas destinadas ao plantio e à criação de animais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A faixa etária em humanos acometida varia de 15

a 49 anos, sendo o sexo masculino o mais prevalente. Quanto ao local da picada, o pé e a perna são os mais atingidos (PINHO; PEREIRA, 2001).

1.3 Aspectos Epidemiológicos

Identificar o animal causador do acidente é procedimento importante na medida em que possibilita a dispensa imediata da maioria dos pacientes picados por serpentes não peçonhentas, viabiliza o reconhecimento das espécies de importância médica da região e auxilia na indicação mais precisa do antiveneno a ser administrado (PINHO; PEREIRA, 2001).

A maioria dos acidentes é classificada como: leve (50,7%), moderado (36,1%) e graves (6,8%). A letalidade geral é relativamente baixa (0,4%). O tempo decorrido entre o acidente, o atendimento e o tipo de envenenamento podem elevar a letalidade em até oito vezes essa taxa, como no envenenamento crotálico, quando o atendimento é realizado mais de 6 a 12 horas após o acidente (4,7%). Por outro lado, a frequência de sequelas, relacionada a complicações locais, é bem mais elevada, sendo de 10% nos acidentes botrópicos e associada a fatores de risco, como o uso de torniquete, picada em extremidades (dedos de mãos e pés) e retardo na administração de soroterapia. Não existe imunidade adquirida contra o veneno de serpentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

1.4 Acidente Botrópico

É causado por serpentes do gênero *Bothrops*, compreendem cerca de 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional. As espécies mais conhecidas são: *B. atrox*, encontradas no norte do Brasil; *B. erytromels*, encontradas na região nordeste; *B. neuwiedi*, encontradas em todo o território nacional, exceto na região norte do país; *B. jararaca*, distribuídas na região sul e sudeste; *B. jararacussu*, encontradas no cerrado da região central e em florestas tropicais do sudeste e *B. alternatus*, distribuídas ao sul do país. São popularmente conhecidas como jararaca, jararacuçu, ouricana, urutu-cruzeira, malha de sapo, patrona, surucucurana, combóia e caiçaca (PINHO; PEREIRA, 2001).

De acordo com Luciano e colaboradores (2009), as principais atividades do veneno botrópico incluem:

- a) Atividade inflamatória aguda - Tem importância fundamental na caracterização clínica do acidente, sendo causada por frações bioquimicamente heterogêneas. Determina atividade inflamatória aguda e causa alterações no local e nas proximidades da picada. Destacam-se ainda a dor e o edema local ou regional e a possível evolução com a formação de bolhas e necrose de partes moles.
- b) Atividade coagulante – É a fração do veneno tipo trombina capaz de ativar os fatores da coagulação sanguínea. Leva ao consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular. Além dessa ação, também existem outras substâncias capazes de ativar a protombina e o fator X, atuando também sobre a agregação e aglutinação plaquetárias.
- c) Atividade Hemorrágica – Deve-se principalmente à atuação do veneno rompendo a integridade do endotélio vascular podendo levar a sangramento em diversos locais. O quadro clínico varia de acordo com a quantidade de veneno inoculado. Ocorrem desde sangramentos clinicamente evidentes, até alterações na coagulação, detectáveis apenas com a realização de exames complementares.

As complicações locais mais graves e temíveis são necroses extensas, síndrome de compartimento e gangrena. São raras as complicações sistêmicas como hipotensão arterial e choque devido à liberação de bradicinina e/ou serotonina pela ação do veneno. A insuficiência renal não é comum nos atendimentos realizados nas primeiras 6 horas. Quando ocorre, é de origem multifatorial: vômitos podem levar à desidratação e estado de choque. Há também a possibilidade de formação de microtrombos nos capilares renais e de ação nefrotóxica do veneno.

As principais manifestações clínicas decorrentes do acidente botrópico estão evidenciadas abaixo, no quadro clínico local (Quadro 1) e no quadro clínico sistêmico (Quadro 2).

Quadro 1- Acidente causado por serpentes do gênero *Bothrops*.

Quadro Clínico Local	
Manifestação Clínica	Acidente Botrópico
Edema	Progressivo, pode atingir todo o membro
Dor	Importante, geralmente acompanha o edema
Equimose	Ao redor do ponto de inoculação do veneno, comum na região dos gânglios regionais; pode aparecer espontaneamente à distância ou em locais de Traumatismo
Adenopatia regional	Comum
Bolhas	No local da picada e ao longo do membro, conteúdo seroso ou soro hemorrágico; aparecem nas primeiras 24h
Necrose	Intensidade variável, dependente da quantidade de veneno inoculada, demora no atendimento, picada em extremidades e uso de torniquete
Síndrome compartimental	Rara, porém precoce; relacionada ao local da picada e gravidade. Fasciotomia não indicada nas primeiras 24h
Complicações	Infecção secundária Seqüela trófica e amputação

Fonte: Informação para os profissionais de saúde (PORTAL DA SAÚDE, 2009).

Quadro 2- Acidente causado por serpentes do gênero *Bothrops*.

Quadro Clínico Sistêmico	
Manifestação Clínica	Acidente Botrópico
Sangue Incoagulável	Bastante comum
Hemorragias	Intensidade e topografia variáveis: gengivorragia, equimoses, hematúria, sangramento digestivo, intracraniano
Urina escura	Por hematúria
Hipotensão/choque	Quando precoce (primeiras 24 h) pode ser decorrente de sequestro de líquido no membro picado, hipovolemia por sangramento ou liberação de substâncias vasoativas
Complicações	Septicemia. Insuficiência renal aguda

Fonte: Informação para os profissionais de saúde (PORTAL DA SAÚDE, 2009).

1.4.1 Diagnóstico

A confirmação laboratorial do acidente pode ser feita através de antígenos do veneno botrópico que podem ser detectados no sangue ou outros líquidos corporais do paciente, através da técnica de ELISA. A avaliação laboratorial é realizada através do tempo de coagulação (TC), que geralmente está aumentado, bem como o tempo parcial de tromboplastina (PTT). São exames importantes para diagnóstico, conduta e evolução clínica. O hemograma geralmente revela leucocitose com neutrofilia e plaquetopenia de intensidade variável. O exame de urina pode apresentar proteinúria, hematúria e leucocitúria. Outros exames complementares importantes incluem dosagem de eletrólitos, uréia e creatinina, com a finalidade de detectar precocemente distúrbios hidroeletrólíticos e insuficiência renal aguda (PINHO; PEREIRA, 2001).

1.4.2 Tratamento

O tratamento específico (Quadro 3) consiste na administração o mais precocemente possível, por via endovenosa, do soro antibotrópico (SAB) e, na falta desse, das associações antibotrópico-crotálico (SABC) ou soro antibotrópico-laquélico (SABL), em ambiente hospitalar. Se o tempo de coagulação (TC) permanecer alterado, 24 horas após a soroterapia, é indicada dose adicional de antiveneno. O local de inoculação do veneno deve ser limpo com água e sabão. A elevação do membro acometido pouco acima do corpo pode facilitar a diminuição do edema. Analgésicos são comumente necessários nos casos mais graves. Os tecidos necrosados devem ser cuidadosamente debridados e os abscessos drenados. Adequada hidratação e profilaxia contra o tétano são medidas complementares importantes. A antibioticoterapia é reservada para casos onde sejam verificados sinais clínicos e laboratoriais de infecção. O paciente deve permanecer, pelo menos por 72 horas após a picada, internado em hospital para controle clínico e laboratorial (PINHO; PEREIRA, 2001).

Quadro 3- Classificação do acidente botrópico quanto à gravidade e a dose recomendada segundo o bulário 2009 do Instituto Butantan (INSTITUTO BUTANTAN, 2009).

Manifestações Clínicas e Tratamento	Classificação		
	LEVE	MODERADA	GRAVE
Locais: dor, edema, equimose	Ausentes ou discretas	Evidentes	Intensas*
Sistêmicas: hemorragia grave, choque, anúria	Ausentes	Ausentes	Presentes
Tempo de Coagulação (TC)**	Normal ou Alterado	Normal ou Alterado	Normal ou Alterado
Soroterapia (ampolas) (10 mL/ampola)	2 a 4	4 a 8	12
Via de administração	Intravenosa	Intravenosa	Intravenosa

* Manifestações locais intensas podem ser o único critério para classificação da gravidade.

** TC normal até 10 min., TC prolongado de 10 a 30 min., TC incoagulável > 30 minutos.

1.5 Acidente Crotálico

É causado por serpentes do gênero *Crotalus*, sendo representada no Brasil por apenas uma espécie, a *Crotalus durissus*, e distribuídas em cinco subespécies: *Crotalus durissus terrificus*, encontrada nas zonas altas e secas da região sul oriental e meridional; *Crotalus durissus collilineatus*, distribuída nas regiões secas da região centro-oeste, Minas Gerais e norte de São Paulo; *Crotalus durissus cascavella*, encontrada nas áreas da caatinga do nordeste; *Crotalus durissus ruruima*, encontrada na região norte do país e *Crotalus durissus marajoensis*, encontrada na ilha de Marajó. São popularmente conhecidas como cascavel, boicininga, maracambóia e maracá (PINHO; PEREIRA, 2001).

O quadro clínico local habitualmente causa manifestações discretas, com dor, eritema, edema, e parestesia local ou regional. As manifestações sistêmicas incluem mal-estar, prostração, sudorese, náuseas, vômitos, sonolência ou inquietação e sensação de boca seca, que podem aparecer precocemente. As manifestações neurológicas surgem nas primeiras horas e melhoram a partir do segundo dia do acidente. A fácies miastênica é característica e denominada “fácies neurotóxica de Rosenfeld”, evidenciando ptose palpebral uni ou bilateral, flacidez da musculatura da face, midríase bilateral semiparalítica, oftalmoplegia, visão turva e/ou diplopia. A miotoxicidade do veneno é evidenciada por intensa mialgia generalizada, que pode ser acompanhada por discreto edema muscular. A principal complicação do acidente crotálico é a insuficiência renal aguda, com necrose tubular, geralmente nas primeiras 48 horas (PINHO; PEREIRA, 2001).

1.5.1 Diagnóstico

A confirmação laboratorial do acidente pode ser feita através de antígenos do veneno crotálico que podem ser detectados no sangue ou outros líquidos corporais do paciente, através da técnica de ELISA. Na avaliação laboratorial, encontramos como resultado da miólise, valores elevados de creatinofosfoquinase (CPK), desidrogenase láctica (LDH) e alanina aminotransferase, também chamada alanina transaminase (ALT). Elevação dos níveis de uréia, creatinina, ácido úrico, fósforo, potássio e diminuição de calcemia, é observada na fase oligúrica da insuficiência renal aguda (IRA) (PINHO; PEREIRA, 2001).

1.5.2 Tratamento

O tratamento específico é a infusão do soro anticrotálico (SAC) ou o soro antibotrópico-crotálico (SABC), endovenosamente, sendo a dose administrada dependente da gravidade do acidente (Quadro 4). É recomendado lavar a região afetada com água e sabão, analgesia e profilaxia do tétano, se necessário. Os pacientes devem ser bem hidratados para prevenir a insuficiência renal. A alcalinização da urina e a diurese osmótica estão indicadas nos casos que evoluam com mioglobinúria, no intuito de diminuir a toxicidade renal. Em casos de oligúria, indica-se o uso de diuréticos de alça, como furosemida. Nos casos em que for constatada insuficiência renal aguda deve ser realizado um tratamento dialítico precoce (PINHO; PEREIRA, 2001).

Quadro 4- Classificação do acidente crotálico quanto à gravidade e a dose recomendada segundo o bulário 2010 da Fundação Ezequiel Dias.(FUNED, 2010).

Manifestações Clínicas e Tratamento	Classificação		
	LEVE	MODERADA	GRAVE
Fácies miastênica/visão turva	Ausente ou tardia	Discreta ou evidente	Evidente
Mialgia	Ausente ou discreta	Discreta	Intensa
Tempo de coagulação (TC)*	Normal ou alterado	Normal ou alterado	Normal ou alterado
Soroterapia (ampolas) 10 ml/ampola	5	10	20
Via de administração	Intravenosa	Intravenosa	Intravenosa

* TC normal até 10 min., TC prolongado de 10 a 30 min., TC incoagulável > 30 minutos.

1.6 Acidente Laquético

As serpentes do gênero *Lachesis* pertencem à espécie *Lachesis muta* com duas subespécies: *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta rhombeata*. É a maior das serpentes peçonhentas das Américas. São popularmente conhecidas por surucucu, surucucu-pico-de-jaca, surucutinga e malha-de-fogo. Habitam áreas florestais como Amazônia, Mata Atlântica e alguns enclaves de matas úmidas do Nordeste. As manifestações clínicas locais são semelhantes às do acidente botrópico, predominando a dor e o edema, que podem progredir para todo o membro acometido. Podem surgir equimose, necrose cutânea, vesículas e bolhas de conteúdo seroso ou sero-hemorrágico nas primeiras horas do acidente. Na maioria dos casos, as manifestações hemorrágicas limitam-se ao local da picada. As manifestações sistêmicas incluem hipotensão arterial, tonturas, escurecimento da visão, bradicardia, cólicas abdominais e diarreia (síndrome vagal) (PINHO; PEREIRA, 2001).

1.6.1 Diagnóstico

Hemograma, dosagens séricas de uréia, creatinina e eletrólitos são indicados dependendo da evolução do paciente. A determinação do tempo de coagulação (TC) é importante medida auxiliar no diagnóstico e acompanhamento dos casos (PINHO; PEREIRA, 2001).

1.6.2 Tratamento

O tratamento específico consiste na infusão endovenosa do soro antilaquético (SAL) ou antibotrópico-laquético (SABL). Na falta dos soros específicos, o tratamento deve ser realizado com soro antibotrópico, apesar deste não neutralizar de maneira eficaz a ação coagulante do veneno laquético. As medidas gerais são as mesmas indicadas para o acidente botrópico. Por serem serpentes de grande porte, considera-se grande a quantidade do veneno inoculado em um acidente (PINHO; PEREIRA, 2001), como mostrado no Quadro 5.

Quadro 5- Orientação para o tratamento do acidente laquético quanto à gravidade e a dose recomendada (PINHO; PEREIRA, 2001).

Orientação para o tratamento	Soroterapia	Via de Administração
Gravidade avaliada pelos sinais e intensidade das manifestações vagais (bradicardia, hipotensão e diarreia)	10 a 20 ampolas de SAL* ou SABL** 10 mL/ampola	Endovenosa

*Soro antilaquético, **Soro antibotrópico-laquético.

1.7 Acidente Elapídico

As serpentes do gênero *Micrurus* compreendem 18 espécies distribuídas em todo o território brasileiro. As espécies mais comuns são *Micrurus corallinus*, encontrada na região sul e litoral da região sudeste; *Micrurus frontalis*, também encontrada nas regiões sul, sudeste e parte do centro-oeste e *Micrurus lemniscatus*, distribuídas nas regiões norte e centro-oeste. Apresentam anéis vermelhos, pretos e brancos em qualquer tipo de combinação. Consideradas animais de pequeno a médio porte são conhecidas por coral, coral verdadeira, ibiboboca ou boi corá. São serpentes bem menos agressivas, têm “habitat” subterrâneo, apresentam presa inoculadora pequena. Raramente causam acidentes, e quando o fazem, geralmente picam os dedos da mão de indivíduos que as manipulam. O quadro clínico caracteriza-se por sintomas que surgem precocemente, em menos de uma hora após a picada. Há discreta dor local, geralmente acompanhada de parestesia com tendência a progressão proximal. As manifestações sistêmicas incluem vômitos, fraqueza muscular progressiva, ptose palpebral, oftalmoplegia e presença de fácies miastênica ou neurotóxica. Também podem surgir mialgia localizada ou generalizada, dificuldade para se manter na posição ereta, dificuldade para deglutir, devido à paralisação do véu palatino. A paralisia flácida da musculatura respiratória compromete a ventilação, podendo evoluir para a insuficiência respiratória aguda e

apnéia, semelhante ao que ocorre no acidente crotálico. O acidente elapídico é considerado muito grave, podendo causar a morte da vítima em curto intervalo de tempo (PINHO; PEREIRA, 2001).

1.7.1 Diagnóstico

Nos acidentes elapídicos não há uma avaliação laboratorial específica para diagnóstico.

1.7.2 Tratamento

O tratamento específico é a administração, por via endovenosa do soro antielapídico (SAE). Todos os casos que apresentam manifestações clínicas são considerados potencialmente graves (Quadro 6). O tratamento geral baseia-se numa adequada assistência ventilatória, boa hidratação, analgesia, cuidados locais e antibioticoterapia, se necessário.

Quadro 6- Orientação para o tratamento do acidente elapídico quanto à gravidade e a dose recomendada (PINHO; PEREIRA, 2001).

Orientação para o tratamento	Soroterapia	Via de Administração
Acidentes raros. Devido ao risco de insuficiência respiratória aguda, devem ser considerados graves.	10 ampolas de SAE* 10 mL/ampola	Endovenosa

*Soro antielapídico.

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) tem como principal atribuição coordenar o processo de coleta, compilação, análise e divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento registrados por uma Rede composta, no ano de 2006, de 36 Centros de Informação e Assistência Toxicológica, localizados em 19 estados brasileiros e no Distrito Federal. O resultado deste trabalho é divulgado através da publicação “Estatística Anual dos Casos de

Intoxicação e Envenenamento”. De acordo com o SINITOX, em 2005 os animais peçonhentos responderam por 23.647 (28%) dos casos de intoxicações em seres humanos no Brasil. Desse total, 8.208 (35%) envolveram escorpiões. As serpentes contribuíram com 4.944 (21%), as aranhas com 4.661 (20%) e os demais animais peçonhentos com 5.834 (25%) (SINITOX, 2005).

1.8 Soros Antiofídicos

Soros são produtos de origem biológica e fazem parte do grupo dos imunobiológicos, sendo utilizados para tratar intoxicações provocadas pelo veneno de animais peçonhentos ou por toxinas de agentes infecciosos, como os causadores da difteria, botulismo e tétano. A primeira etapa da produção de soros antipeçonhentos é a extração do veneno - também chamado peçonha - de animais como serpentes, escorpiões, aranhas e taturanas. Após a extração, a peçonha é submetida a um processo chamado liofilização, que desidrata e cristaliza o veneno (INSTITUTO BUTANTAN, 2009).

1.8.1 Produção de Soros

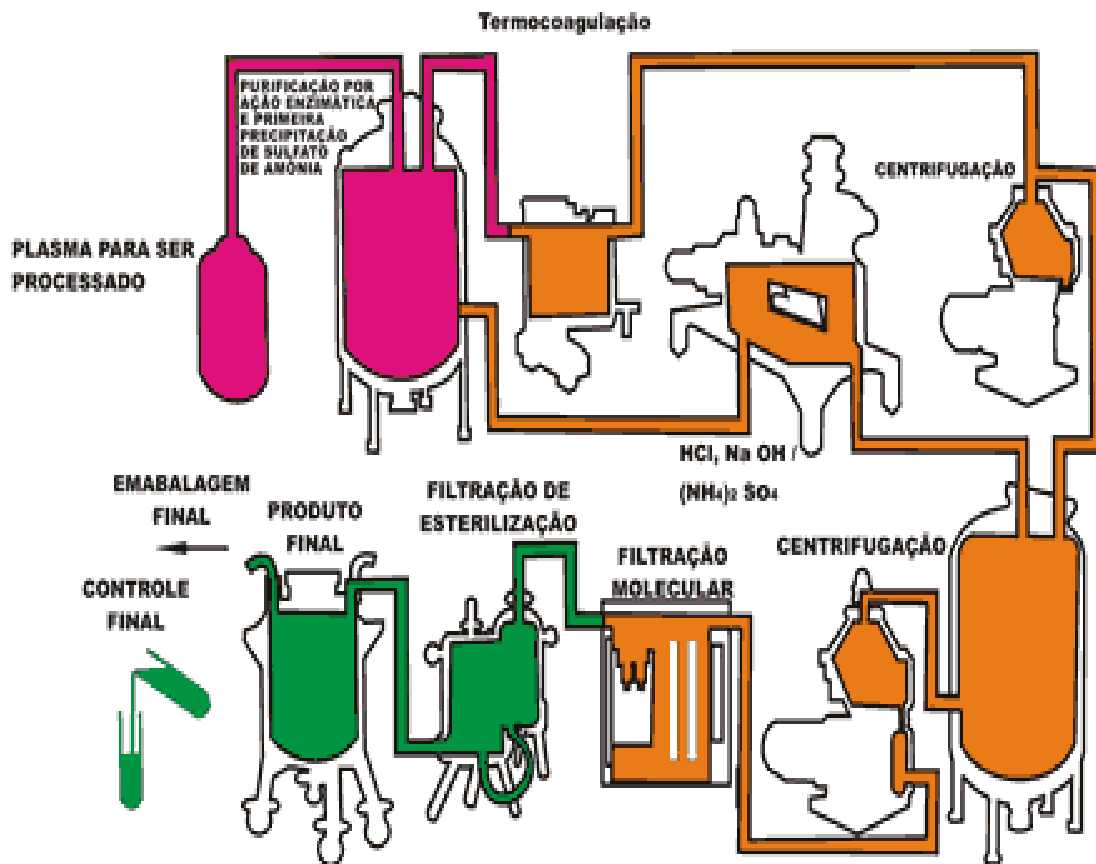
As três maiores instituições produtoras de soros e vacinas no Brasil são o Instituto Butantan (SP), Instituto Vital Brazil (RJ) e a Fundação Ezequiel Dias (MG). Os produtos biológicos são adquiridos pelo Ministério da Saúde e utilizados pelo Programa Nacional de Imunização (PNI), através do envio às Secretarias de Saúde para serem distribuídos aos postos de aplicação de soro e vacinações. Além das Secretarias de Saúde, somente os Serviços de Saúde das Forças Armadas recebem o soro.

A produção do soro é realizada de acordo com as seguintes etapas:

1. O veneno liofilizado (antígeno) é diluído e injetado no cavalo, em doses adequadas. Esse processo leva 40 dias e é chamado hiperimunização.
2. Após a hiperimunização, é realizada uma sangria exploratória, retirando uma amostra de sangue para medir o teor de anticorpos produzidos em resposta às injeções do antígeno.

3. Quando o teor de anticorpos atinge o nível desejado, é realizada a sangria final, retirando-se cerca de quinze litros de sangue de um cavalo de 500 kg em três etapas, com um intervalo de 48 horas.
4. No plasma (parte líquida do sangue) são encontrados os anticorpos. O soro é obtido a partir da purificação e concentração desse plasma (Figura 1).
5. As hemácias são devolvidas ao animal, através de uma técnica desenvolvida no Instituto Butantan, chamada plasmaferese. Essa técnica de reposição reduz os efeitos colaterais provocados pela sangria do animal.
6. No final do processo, o soro obtido é submetido a testes de controle de qualidade:
 - 6.1. atividade biológica - para verificação da quantidade de anticorpos produzidos;
 - 6.2. esterilidade - para a detecção de eventuais contaminações durante a produção;
 - 6.3. inocuidade - teste de segurança para o uso humano;
 - 6.4. pirogênio - para detectar a presença de **contaminantes pirogênicos** , que provocam alterações de temperatura nos pacientes e
 - 6.5. testes físico-químicos.

Figura 1. Processamento do Plasma para obtenção de Soro



Fonte: (CANTER, 2008)

1.9 Soro Antibotrópico

O soro antibotrópico é uma solução purificada de imunoglobulinas específicas, obtidas de soro de eqüídeos hiperimunizados com veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. O soro é purificado por digestão péptica e fracionamento salino. Usa-se fenol como preservativo a 0,35%. Cada mililitro neutraliza 5,0 mg de veneno de referência de *B. jararaca*, em camundongos. É indicado para o tratamento de acidentes comprovados de picadas de serpentes do gênero *Bothrops* (*jararaca*, *jararacussu*, *urutu*, *cotiara* e outras). Os acidentes ofídicos nas crianças são sempre mais graves, e a dose de soro nunca deve ser inferior à recomendada para o adulto.

A determinação do tempo de coagulação tem sido usada como parâmetro da eficácia da dose de antiveneno (Quadro 3). Se após 12 horas do início do tratamento o sangue estiver incoagulável, deve-se realizar uma soroterapia adicional para neutralizar 100 mg de veneno, por via intravenosa (2 ampolas) (INSTITUTO VITAL BRAZIL, 2009).

1.9.1 Composição do Soro Antibotrópico

A composição do soro antibotrópico é comum para os 3 produtores.

Cada ampola de 10 mL contém:

Fração F(ab')₂ de imunoglobulinas específica e purificada que neutralizam, no mínimo, 50 mg de veneno de referência de *Bothrops jararaca* (soroneutralização em camundongo).

Fenol.....(máximo) 35 mg

Cloreto de Sódio..... 85 mg

Água para injetáveis..... q.s.p.10 mL

Fonte: Bulário da FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (FUNED), 2009.

1.10 Controle da Qualidade

É responsabilidade do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), desde 1983, o controle da qualidade dos soros antes de serem distribuídos às Secretarias de Saúde. Atualmente os ensaios de controle de qualidade realizados pelo INCQS para o soro antibotrópico são: Pirogênio, Análise de Protocolo, Potência Antibotrópica, Esterilidade Bacteriana e Fúngica, pH, Teor de Fenol, Teor de Sólidos Totais e Volume Médio.

1.11 Pirogênio. (Histórico).

Muitos médicos na antiguidade, começando com os gregos, acreditavam que a febre devia ser estimulada como um meio de combate à doença. Hipócrates

acreditava que a febre servia para cozinhar “humores” em excesso (a causa pretensa de doença naquele dia) e portanto removê-los do corpo. Somente após o início do século XVIII que sérias incursões foram feitas no estudo das causalidades da febre. Os primeiros estudos surgiram a partir de observações associando o início da febre em homens e animais quando em contato com materiais orgânicos em putrefação. Entre 1809 e 1822, Gaspard injetou extrato fluido pútrido em cachorros e assim demonstrando ser uma das causas de febre e doença. Em 1823, François Magendie observou condições pútridas no interior e ao redor de muitos portos e concluiu que as águas poluídas eram habituais na ocorrência de muitas doenças graves, incluindo febre tifóide, peste, febre intermitente, disenteria, febre amarela, cólera, e assim por diante. Ele seguiu os passos experimentais de Gaspard e descobriu que os peixes de águas pútridas eram particularmente um potente indutor de febre. Ele demonstrou que, sem a decomposição da matéria orgânica putrefata, nenhuma febre poderia ser induzida e que, para ser eficaz, deveria ser absorvida através das veias. Em meados do século XIX, o estudo de ferimentos ou infecções sépticas foi elucidado através de várias publicações incluindo a de Theodor Billroth “*Observations on Fever Caused by Wounds and Accidental Wound Diseases*”. na qual ele utilizou os termos “pirogênio” e “pirogênico” pela primeira vez. Ele isolou uma bactéria que chamou de *Coccobacteria septica* e afirmou ser o agente causador da infecção no ferimento. Em 1868, Ernst Von Bergmann, publicou “*The Putrid Poison and the Putrid Intoxication*” seguido por “*On Sepsin, the Poison of Putrid Substances*” e “*On Fever Caused by Products of Putrefaction and Inflammation*”. Bergmann acreditava que pirogênio, ou “*sepsin*” como ele denominou, era uma substância quimicamente definida que ele produziu de forma semi-purificada a partir de putrefação de levedura. Em 1880, Koch contribuiu para o entendimento da infecção em feridas, escrevendo “*Investigations on the Aetiology of Infectious Wound Diseases*”, tendo como base suas próprias experiências de guerra, com milhares de soldados, bem como, com suas experiências em animais, utilizando injeções de culturas puras de bactérias. A partir deste período, o estudo das causas da febre teve seu foco voltado para sua origem bacteriana. Em 1892, Richard Pfeiffer, um dos estudantes de Koch em Berlim, descobriu que a bactéria *Vibrio cholerae* produzia dois tipos distintos de toxinas: uma exotoxina termo-lábil e uma substância termo-resistente que não era secretada pela célula mas liberada mediante a desintegração celular. Pfeiffer primeiro usou a palavra “endotoxina” para descrever essa “toxina

interna”, que na verdade acabou por ser uma espécie de equívoco, uma vez que ela se encontra na superfície das células, contudo, estava correto em afirmar que ela é parte do organismo e não uma secreção como as exotoxinas. Paralelamente, em 1892, Eugenio Centanni na Universidade de Bolonha extraiu uma toxina termoestável de *Salmonella typhi*, o agente causador da febre tifóide, chamando-a de “pirotoxina”. Hoje sabe-se que as toxinas termoestáveis de Pfeiffer e Centanni são a mesma endotoxina comum às bactérias Gram negativas (WILLIAMS, 2007).

1.11.1 Classificação dos pirogênios

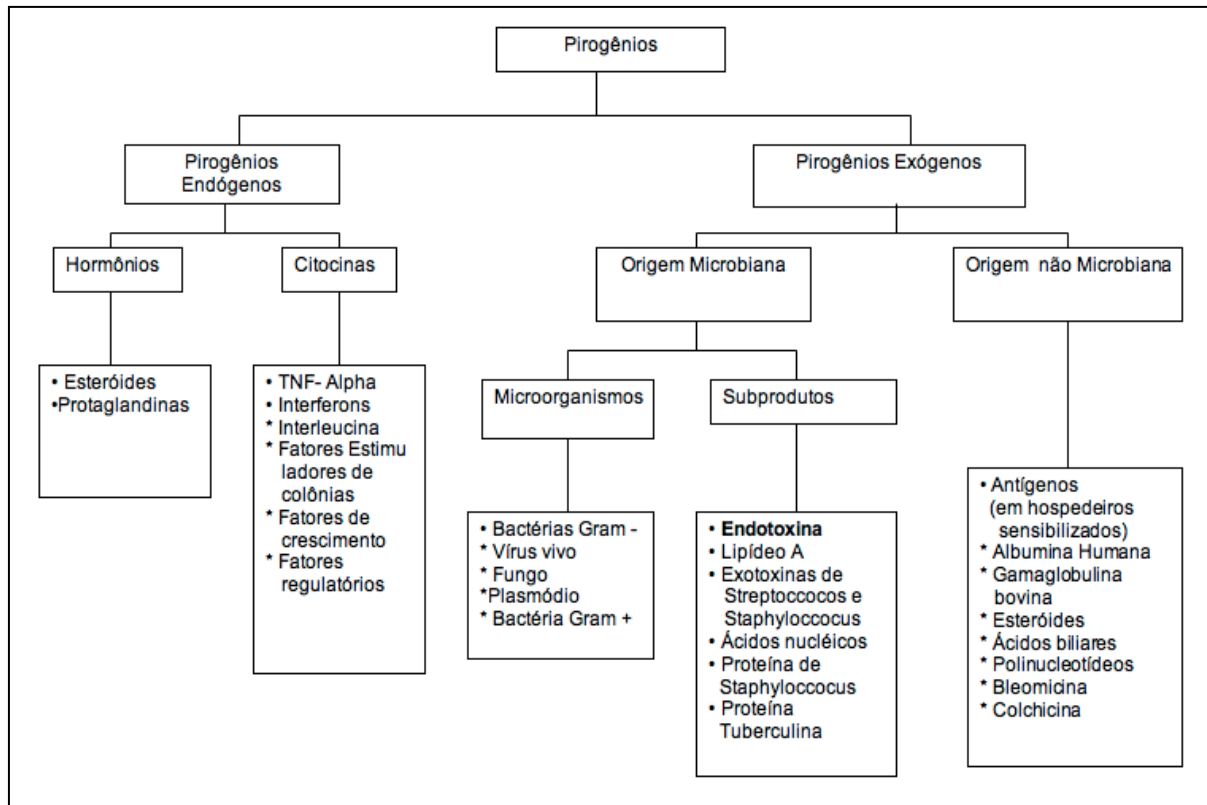
Os pirogênios são divididos em exógenos ou endógenos, tendo como base sua origem externa ou interna ao corpo, respectivamente. Os termos “pirogênio endógeno” e “mediadores endógenos” referem-se às substâncias produzidas pelo organismo e que são responsáveis pela mediação de respostas inflamatórias, na coagulação e nos mecanismos de produção de febre (Quadro 7). O “pirogênio exógeno” é qualquer substância estranha ao organismo capaz de induzir uma resposta febril em consequência de sua injeção ou infecção, incluindo o “pirogênio” microbiano, sendo a endotoxina o mais potente de todos (Quadro 7). “Pirogênio exógeno”, não microbiano, inclui certos agentes farmacológicos ou, por sensibilização do hospedeiro, antígenos, tais como albumina humana (WILLIAMS, 2007).

O termo “pirogênio” vem ao longo do tempo sendo menos utilizado, tanto em termos gerais, quanto específicos. O termo tem entrado em desuso: 1) pelo conceito equivocado do ensaio do LAL, como ensaio de pirogênio *in vitro*, 2) pela caracterização de vários subprodutos microbianos análogos ao do hospedeiro ativo, 3) pela identificação de respostas nocivas, que não incluem febre e 4) talvez o mais importante, pelo recente enfoque nos mecanismos celulares e moleculares que não estão particularmente relacionados à febre como uma medida da resposta biológica (WILLIAMS, 2007).

Quanto à perda de precisão relacionada ao termo “pirogênio”, existe atualmente muitos compostos identificados e ativos no hospedeiro, com potências biológicas variáveis e, às vezes atuando em conjunto. Desta forma, o termo “pirogênio” requer uma melhor qualificação e descrição. Dezenas de compostos microbianos têm sido identificados seja para induzir febre, seja para ativar

hospedeiros que possam levar à febre, especialmente em combinação com a endotoxina (WILLIAMS, 2007).

Quadro 7- Pirogênicos endógenos e exógenos de origem microbiana e não microbiana



Adaptado de Williams, 2007.

1.12 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 lipopolissacarídeo (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).

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 o 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 cultivadas em laboratório. Para 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).

1.12.1 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 2).

A maioria dos trabalhos sobre a estrutura química de endotoxina tem sido feita 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 polissacarídeos (TODAR, 2008).

1.12.2 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 fosfatos (PO_4), 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 LAL.

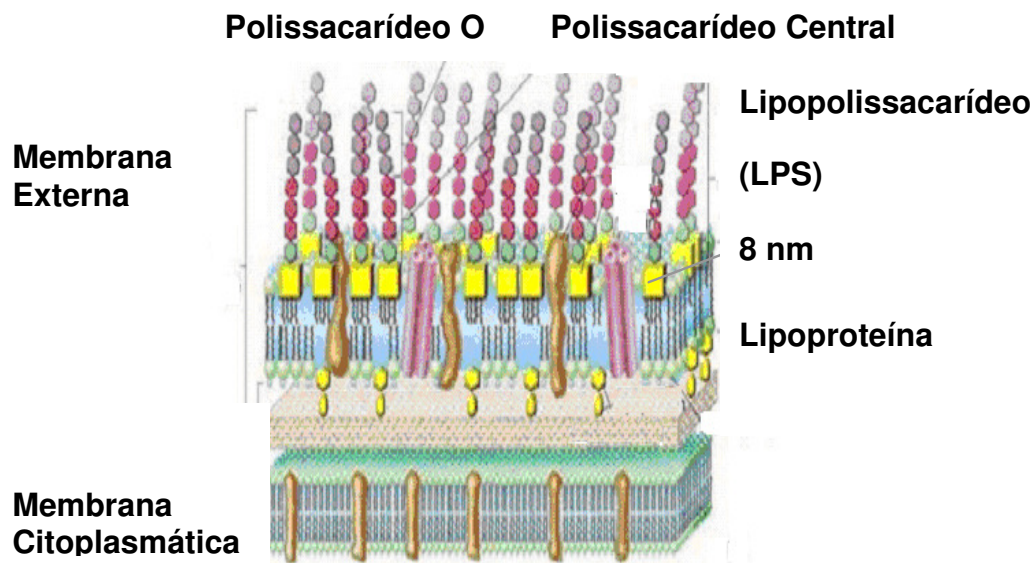
Região II. Antígeno central R ou polissacarídeo R – Está ligado à posição 6 de uma NAG e constituído por uma pequena cadeia de açúcares.

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 polissacarídico, 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).

1.12.3 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 através de um complexo ataque à membrana (MAC), 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, leucocitose, etc (TODAR, 2008).

Figura 2. Esquema da parede celular de bactéria Gram negativa



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

1.13 Métodos Alternativos

Atualmente tem sido grande a preocupação em substituir alguns ensaios em animais (métodos *in vivo*) por métodos *in vitro*. O desenvolvimento e a utilização de metodologias alternativas aos estudos realizados com animais de laboratório é meta de longa data dentro da comunidade científica (STEPHENS; GOLDBERG; ROWAN, 2001)

O pensamento surgido há muitos anos foi somente fortalecido após o lançamento do conceito dos 3Rs, lançado em 1959 por Russell e Burch.

O princípio dos 3 Rs é assim denominado em função das iniciais, em inglês, de seus principais objetivos: 1) Reduction (redução), 2) Refinement (refinamento) e 3) Replacement (substituição), que preconiza a redução do número de animais utilizados na pesquisa, a melhoria na condução dos estudos, no sentido de reduzir o sofrimento ao mínimo possível, e a busca de métodos alternativos que por fim, substituam os testes *in vivo* (CAZARIN et al., 2004).

Dessa forma, o propósito principal do princípio dos 3Rs é servir como um conceito unificador, um desafio e uma oportunidade para a obtenção de benefícios científicos, econômicos e humanitários (BALLS; VAN ZELLER; HALDER, 2000).

As ações e metas fundamentais para o cumprimento dos objetivos do princípio dos 3 Rs (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004) estão descritas abaixo.

Redução:

- desenvolver novos protocolos com a utilização do menor número de animais por experimento;
- evitar a replicação dos estudos conduzidos *in vivo*;
- evitar a condução de estudos utilizando modelos animais que têm demonstrado irrelevância na extrapolação dos efeitos para a espécie humana;
- desenvolver metodologias *in vivo* e *in vitro*, com o intuito de utilizá-las como triagem (*screening*) para a identificação do efeito de relevância e para posterior investigação;
- aperfeiçoar a qualidade técnica dos ensaios;
- obter o maior número possível de informações relevantes em um pequeno número de animais.

Refinamento:

- utilizar novas metodologias a partir do avanço técnico e científico e da investigação direcionada para os “*endpoints*” humanos (efeitos de maior relevância). Por essa razão, elementos qualitativos devem ser empregados, além da preocupação com a qualidade de vida do animal durante os procedimentos e a necessidade de reduzir o risco e o grau de sofrimento dos mesmos.

Substituição:

- desenvolver métodos alternativos à experimentação animal, tais como ensaios *in vitro* inclusive com utilização de células humanas.

Nesse sentido, muitos pesquisadores têm procurado desenvolver métodos que reduzam a variabilidade biológica, aumentem a sensibilidade e mantenham relação de respostas com os ensaios à que se destinam substituir. Outra vantagem

na busca de métodos alternativos ao uso de animais reside na possibilidade de que laboratórios de controle que não possuam infraestrutura para a criação/manutenção de animais de laboratório possam ter em suas atividades analíticas métodos eficazes que permitam avaliar o potencial toxicológico de produtos.

1.13.1 Razões para a Substituição do Ensaio de Pirogênio pelo Ensaio de LAL

A Segunda Guerra Mundial ocasionou uma grande demanda em relação à terapia envolvendo parenterais de grande volume e chamou a atenção para a necessidade de um ensaio oficial da Farmacopéia Americana (USP) para garantir a ausência de pirogênios em preparações intravenosas. Assim, em 1941, o Comitê de Revisão da USP autorizou 3 Subcomissões em ensaios biológicos para a realização do estudo colaborativo de pirogênios. O estudo foi realizado pelo Food and Drug Administration (FDA), National Institute of Health (NIH) e por 14 laboratórios farmacêuticos. Os resultados desse estudo levaram à incorporação do primeiro ensaio oficial de pirogênio em coelhos na 12ª edição da USP em 1942 (WILLIAMS, 2007).

Por mais de 40 anos o ensaio de pirogênio em coelhos permaneceu invariável e sua efetividade foi pouco questionada. Hoje, para aprovação e comercialização de grande parte dos produtos farmacêuticos e biotecnológicos administrados por via parenteral, os principais órgãos regulatórios internacionais exigem o controle pelo método de LAL (MORALES, 2004).

A importância de se controlar a contaminação por endotoxina na produção de soluções parenterais torna-se evidente quando confrontada com quatro aspectos de sua existência. A primeira é a sua ubiquidade na natureza; a segunda é a potente toxicidade que a endotoxina apresenta em relação a outros pirógenos; a terceira é a sua estabilidade ou capacidade de reter a sua natureza endotóxica após ser submetida a condições extremas de temperatura e a quarta é a relativa probabilidade de sua ocorrência em soluções parenterais. A preocupação com a endotoxina a partir de uma perspectiva de controlar sua contaminação na produção de parenterais superou as preocupações em proteger as contaminações oriundas de todos os outros tipos de pirogênios predominantes na segunda metade de quase um século de produção de parenterais (a primeira metade dispendo de pouco ou

nenhum controle da qualidade). A mudança no paradigma de preocupação passando de pirogênios em geral para endotoxina, especificamente se iniciou com o teste em água para soluções injetáveis e de materiais em processo, culminando na disponibilidade do teste do LAL para o produto final como uma alternativa ao teste de pirogênio da *United States Pharmacopeia* (USP) em 1980. A questão central que se levantou sobre a proposta de substituição do teste de pirogênio em coelhos pelo teste de LAL, foi : como se pode ter a certeza em testes apenas para a detecção de endotoxina de que outros pirógenos microbianos passarão despercebidos no processo de fabricação parenteral? Tem se respondido a questão em parte, ao se considerar a ubiqüidade, estabilidade e relativa pirogenicidade de endotoxina de bactérias Gram negativas, mas também pelos requisitos mínimos de crescimento de bactérias Gram negativas que permitem seu crescimento em águas purificadas. Inversamente, a resposta pode ser encontrada na desqualificação da preocupação excessiva para cada tipo de organismo não Gram negativo que poderia ocorrer nas operações de produção de parenterais, devido: (1) a predisposição ambiental do organismo que impede a sua proliferação em larga escala no processo de produção de parenterais aquosos, (2) a relativa facilidade de degradação de seus subprodutos (com exceção das exotoxinas termoestáveis de bactérias Gram positivas que têm significantes necessidades de crescimento), (3) ao emprego de modernos procedimentos assépticos na produção e (4) ao uso de métodos de controle da qualidade exigidos para as Boas Práticas de Produção (GMPs) (WILLIANS, 2007).

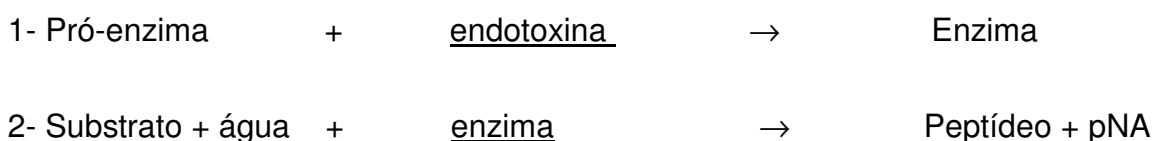
O Quadro 8 resume as vantagens e desvantagens dos ensaios *in vitro* do LAL e do pirogênio *in vivo*.

Quadro 8- Vantagens e Desvantagens do Ensaio do LAL X Ensaio de Pirogênio

Ensaio do LAL	Ensaio de Pirogênio
Detecta somente endotoxinas de bactérias Gram negativas	Detecta outros pirógenos além de endotoxinas
Várias amostras podem ser analisadas simultaneamente	Não pode utilizar um grande número de animais simultaneamente
A execução do ensaio é feita por uma única pessoa	São necessárias no mínimo duas pessoas para a execução do ensaio
É econômico, dispensando altos gastos com equipamentos especializados	Necessita de altos gastos para construção de um biotério, assim como, sua manutenção
É sensível, detectando pequenas concentrações de endotoxina. É um ensaio quantitativo	Não é sensível para detecção de pequenas concentrações de endotoxina e/ou outros pirógenos. Ausência de quantificação.
É um teste <i>in vitro</i>	Envolve resistência e estresse dos animais, bem como, a questão ética de sua utilização.
Controles positivos e negativos são realizados a cada ensaio	Recomenda-se uma curva dose-resposta a cada seis meses para avaliar a resposta dos animais
Duração do ensaio (2 horas em média)	Duração do ensaio (6 horas em média)

1.14 Princípio do ensaio de Endotoxina Bacteriana (LAL)

O uso do LAL para detecção de endotoxina evoluiu a partir da observação de Bang ao constatar que uma infecção por bactéria Gram negativa em *Limulus polyphemus*, o caranguejo ferradura, resultou em coagulação intravascular. Levin e Bang (1964) demonstraram que a formação de um coágulo no *Limulus polyphemus* era resultado de uma reação entre a endotoxina e uma proteína coagulável na circulação das células sanguíneas (amebócitos) do *Limulus*. Os dois pesquisadores desenvolveram um anticoagulante adequado para o sangue (amebócitos) do *Limulus* e prepararam um lisado que é um indicador extremamente sensível à presença de endotoxina. 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). O teste do LAL pelo método cromogênico cinético (QCL-Cinético) utiliza a parte inicial da reação endotoxina/LAL para ativar uma enzima, que por sua vez, libera p-nitroanilina (pNA) de um substrato sintético Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA produzindo uma coloração amarela:



A endotoxina de bactéria Gram negativa catalisa a ativação de uma pró-enzima no LAL. A via de ativação inicial é desta forma, determinada pela concentração de endotoxina ali presente. A enzima ativada catalisa a formação da p-nitroanilina (pNA) a partir da descoloração do substrato Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. A pNA transformada é medida fotométricamente no comprimento de onda de 405 nm (nanômetros) continuamente durante o período de incubação. A concentração de endotoxina em uma amostra é calculada a partir do seu tempo de reação em comparação ao tempo de reação de uma solução padrão contendo uma quantidade conhecida de endotoxina (A CAMBREX COMPANY, 2008).

1.14.1 Ensaio de LAL- QCL-Cinético

O ensaio LAL pelo método QCL (Quantitativo Cinético em *Limulus*) é um ensaio quantitativo, cinético para detecção de endotoxina de bactérias Gram

negativas. Uma amostra é misturada ao LAL/substrato reagente, colocada em uma placa incubadora e monitorada automaticamente até o desenvolvimento de uma coloração amarela. O tempo necessário para o aparecimento da coloração amarela (Tempo de reação) é inversamente proporcional à quantidade de endotoxina presente na amostra, ou seja, na presença de uma grande quantidade de endotoxina a reação ocorre mais rapidamente (em menor tempo), ao contrário, na presença de uma pequena quantidade de endotoxina o tempo para que ocorra a reação é maior. A concentração em amostras desconhecidas deve ser calculada a partir de uma curva padrão. De forma contínua durante todo o ensaio, o programa de computador leitor de microplaca/WinKQCL® monitora, a 405 nm, a absorvância em cada orifício da microplaca. Usando a leitura de absorvância inicial de cada orifício como seu próprio branco, o leitor determina o tempo necessário para que a absorvância aumente 0,200 unidades de absorvância. Esse tempo é denominado “tempo de reação”. O programa de computador executa automaticamente uma correlação linear log/log do “tempo de reação” de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Se o valor absoluto do coeficiente de correlação (r) for $\geq 0,980$, um modelo polinomial pode ser usado para construir uma curva padrão e, assim, prever as concentrações de endotoxina presentes nas amostras em teste. De forma a calcular as concentrações de endotoxina em amostras desconhecidas, todo teste de LAL QCL-Cinético deve ser submetido a uma curva padrão de referência. Devido a larga faixa de concentração em que os valores de endotoxina podem ser determinados, é possível ajustar a faixa quantitativa de qualquer teste através do ajuste da concentração dos padrões de endotoxina usados para gerar a curva padrão. Um mínimo de 3 (três) concentrações do padrão é requerido. O ensaio do LAL QCL-Cinético foi desenvolvido para ser linear de 0,005 EU/mL a 50 EU/mL. (A CAMBREX COMPANY, 2008).

1.14.1.1 Linearidade

A linearidade da curva padrão na faixa de concentrações usada para determinar os valores de endotoxina deve ser verificada. Não menos do que 3 (três) concentrações padrões de endotoxina, englobando a faixa de concentração desejada, e um branco de água reagente LAL devem ser ensaiadas no mínimo em triplicata de acordo com os parâmetros de teste para o ensaio de Qualificação Inicial.

O valor absoluto do coeficiente de correlação (r) da curva padrão calculada deve ser $\geq 0,980$ (A CAMBREX COMPANY, 2008).

1.14.1.2 Repetitividade

As amostras devem ser analisadas em replicatas para estabelecer uma boa técnica e um baixo Coeficiente de Variação (CV) (A CAMBREX COMPANY, 2008).

1.14.1.3 Tipos de ensaios do LAL (método QCL-cinético)

Existem 04 (quatro) tipos de ensaio do LAL QCL-cinético:

1- RSE/CSE - Um ensaio RSE/CSE é designado para determinar a potência de um Controle Padrão de Endotoxina (CSE) em termos de unidades de concentração do padrão de Referência de Endotoxinas (RSE) da USP (United States Pharmacopeia). O ensaio requer uma série única de diluições da RSE e uma ou mais diluições da CSE. O FDA (Food and Drug Administration) afirma que a utilização do Certificado de Análise do LAL QCL- Cinético fornecido pelo produtor, no qual consta a comparação RSE/CSE, isenta o laboratório de ter que realizar o ensaio (FDA, 1992).

2- Qualificação Inicial - O ensaio de Qualificação Inicial é realizado de acordo com o requerimento estabelecido pelo FDA no “Guia de Validação do Teste de Lisado do Amebócito de *Limulus* para o ensaio de endotoxina de produtos parenterais acabados para uso humano e animal, produtos biológicos e dispositivos médicos” (FDA, 1992). Esse ensaio é requerido como parte da validação do ensaio de LAL e também deve ser realizado a cada novo lote de LAL QCL-Cinético utilizado no laboratório. O ensaio estabelece uma correlação linear log/log dos valores do tempo de reação individual para cada replicata de cada padrão de endotoxina.

3- Inibição/Potencialização – O ensaio de Inibição/Potencialização de um produto é indicado para determinar qual nível de diluição do produto supera a inibição ou potencialização. A inibição do produto ocorre quando substâncias presentes na amostra a ser testada interferem na reação do reagente LAL. Essa inibição resulta em um tempo de reação mais longo, indicando níveis mais baixos de endotoxina do que realmente podem estar presentes na amostra. A ausência de inibição do produto deve ser determinada para cada amostra específica, não diluída ou em uma

diluição apropriada. A potencialização do produto ocorre quando substâncias presentes na amostra a ser testada interferem na reação do reagente LAL. Essa potencialização resulta em um tempo de reação mais rápido, indicando níveis mais altos de endotoxina do que realmente podem estar presentes na amostra. A ausência de potencialização do produto deve ser determinada para cada amostra específica, não diluída ou em uma diluição apropriada.

Para essa verificação de Inibição/Potencialização do produto, uma alíquota da amostra é contaminada com uma concentração conhecida de endotoxina, sendo denominado CPP (Controle Positivo do Produto) ou *Spike* (fortificação do produto). A concentração de endotoxina do CPP deve estar compreendida entre o mais baixo e o mais alto padrão de endotoxina usado no ensaio (curva padrão).

4- Ensaio de Rotina – O ensaio de rotina calcula a concentração de endotoxina presente em uma determinada amostra, em comparação com o desempenho de uma série de padrões de endotoxina. O WinKQCL® calcula automaticamente a quantidade de endotoxina recuperada no CPP, permitindo uma comparação com a quantidade conhecida de endotoxina na amostra contaminada.

1.14.1.4 Interferentes

Os produtos testados no ensaio de endotoxina bacteriana (LAL) podem algumas vezes apresentar em suas formulações fatores de interferência que podem mascarar o resultado do ensaio. Esse problema pode ser resolvido através da diluição do produto até um ponto em que o fator de interferência não mais afete o ensaio. Essa diluição, porém, não pode exceder a máxima diluição válida (MDV) para o produto. Alguns exemplos desses interferentes são: pH do produto, cátions divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2}), agentes quelantes (EDTA).

1.15 Validação de métodos

Os conceitos envolvendo validação de métodos analíticos são constante preocupação das principais agências reguladoras mundiais. Segundo a Farmacopéia Americana, 32ª edição, “validação de um procedimento analítico é o processo pelo qual é estabelecido, por estudos laboratoriais, que as características de desempenho do processo atenda os requisitos para os quais as aplicações

analíticas se destinam”. No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR ISO/IEC 17025 define validação como sendo “a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em sua Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, publicou o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” onde preconiza que “a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.

1.15.1 Parâmetros de desempenho de validação

O objetivo de uma validação, de acordo com a Resolução- RE nº 899 da ANVISA (ANVISA, 2003) é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Para fins de validação, os testes são classificados em 4 categorias de acordo com sua finalidade (Quadro 9).

Dentre os parâmetros de desempenho a serem avaliados na validação de uma metodologia podemos destacar: especificidade/seletividade; linearidade; intervalo; precisão; limite de detecção (sensibilidade); limite de quantificação; exatidão e robustez. Para se ter a garantia da qualidade analítica dos resultados obtidos, é preciso que todos os equipamentos utilizados na validação estejam devidamente calibrados e os analistas qualificados e adequadamente treinados (ANVISA, 2003). O laboratório de endotoxina bacteriana do INCQS é acreditado pelo INMETRO.

Quadro 9- Classificação dos testes, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003).

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Para cada categoria aplica-se um conjunto de testes (parâmetros de desempenho), relacionados no Quadro 10.

Quadro 10- Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade. Adaptado do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (ANVISA, 2003).

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria V
		Quantitativo	Ensaio limite		
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão : Repetitividade Intermediária	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

A seleção dos parâmetros deve ser feita baseada no objetivo de cada método e no princípio básico de medição que se utiliza. Através de uma avaliação crítica do método e das orientações específicas para a execução de uma validação o técnico poderá estabelecer quais parâmetros deverão ser avaliados (POP nº 65.1120.065/INCQS, 2007). O teste do LAL, em questão, se enquadra na categoria II quantitativo (Quadros 9 e 10).

1.15.2 Protocolo de Validação

Para a validação do ensaio de endotoxina bacteriana (LAL) para o soro antibiótico, pelo método cromogênico cinético, serão avaliados os seguintes parâmetros de desempenho: Seletividade, Linearidade/Curva-padrão, Precisão (Repetitividade e Precisão intermediária) e Exatidão. O ensaio de Qualificação Inicial do laboratório, bem como, o ensaio de Inibição/Potencialização serão realizados antes de serem avaliados os parâmetros de desempenho.

1.15.2.1 Qualificação Inicial

A qualificação inicial permite avaliar o material utilizado no ensaio e o desempenho do analista, bem como, a eficácia dos reagentes utilizados (endotoxina, reagente LAL e água apirogênica). Utiliza-se no ensaio um Controle Padrão de Endotoxina (CSE) ou o padrão de Referência de Endotoxina (RSE) da USP (United States Pharmacopeia), de potência conhecida, com pelo menos 3 concentrações, em triplicata, que contemple a faixa desejada da curva-padrão de endotoxina. O coeficiente de correlação, r , deve ser $\geq 0,980$ para comprovação da linearidade da curva (FDA,1992)..

1.15.2.2 Ensaio de Inibição/Potencialização

É indicado para determinar em quais diluições do produto pode-se trabalhar sem que haja interferentes para inibir ou potencializar a presença de endotoxina. No Teste de Inibição/Potencialização o controle do produto contaminado ou *spike* é testado juntamente com o produto não contaminado. A endotoxina recuperada no produto contaminado deve estar dentro da faixa de aceitação de recuperação, ou seja, entre 50% e 200% (USP, 2009). Recomenda-se uma recuperação próxima de 100%.(A CAMBREX COMPANY, 2008).

1.15.2.3 Seletividade

É a habilidade do método bioanalítico de medir (quantificar) e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes no produto, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). O teste de LAL QCL-cinético utiliza uma preparação de lisado de amebócitos do *Limulus* (LAL) , em combinação com um incubador fotométrico e um programa de computador apropriado, para detecção fotométrica da endotoxina. Este produto foi projetado para ser usado como um teste para detecção de endotoxina *in vitro* para produtos parenterais acabados, produtos biológicos e dispositivos médicos de uso humano e animal.(A CAMBREX COMPANY, 2008).

1.15.2.4 Linearidade/Curva padrão

É a capacidade de uma metodologia demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito no produto, demonstrando haver uma relação linear. Como critérios para a validação serão utilizados o coeficiente de correlação, a interseção da reta com o eixo Y (coeficiente linear) e o coeficiente angular, através de tratamento estatístico realizado pelo programa de computador. Os critérios devem obedecer aos parâmetros descritos abaixo (Quadro 11).

Quadro 11- Parâmetros e Especificações da Curva-Padrão (A CAMBREX COMPANY, 2008).

Parâmetros	Especificações
Coeficiente de correlação linear	-1 a - 0,980
Interseção com o eixo Y	2,5 a 3,5
Coeficiente angular	-0,4 a -0,1

1.15.2.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

1.15.2.5a Repetitividade (precisão intra-corridas)

Repetitividade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. As amostras replicadas (em triplicatas) devem ser testadas para estabelecer uma boa técnica e propiciar a obtenção de um baixo CV. Serão testados os lotes n° 0907144/B; 095105 B e 080610-24, em triplicata, na diluição de 1:10. Serão determinados os tempos de reação, em segundos, de cada amostra O percentual (%) do CV dos tempos de reação para cada triplicata deve ser < 10% (A CAMBREX COMPANY, 2008) e obtido a partir da fórmula abaixo:

CV (%) = (desvio padrão dos tempos de reação da amostra em triplicata / média do tempo de reação) X 100.

1.15.2.5b Precisão Intermediária (precisão inter-corridas)

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A determinação da precisão intermediária será realizada em dias diferentes, com analistas diferentes, com 03 determinações para cada analista, totalizando 06 determinações. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$CV (\%) = (DP / CMD) \times 100$, onde;

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

Para critérios de validação o CV não pode exceder a 15% (ANVISA, 2003).

1.15.2.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado (*spike*) à amostra, e é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

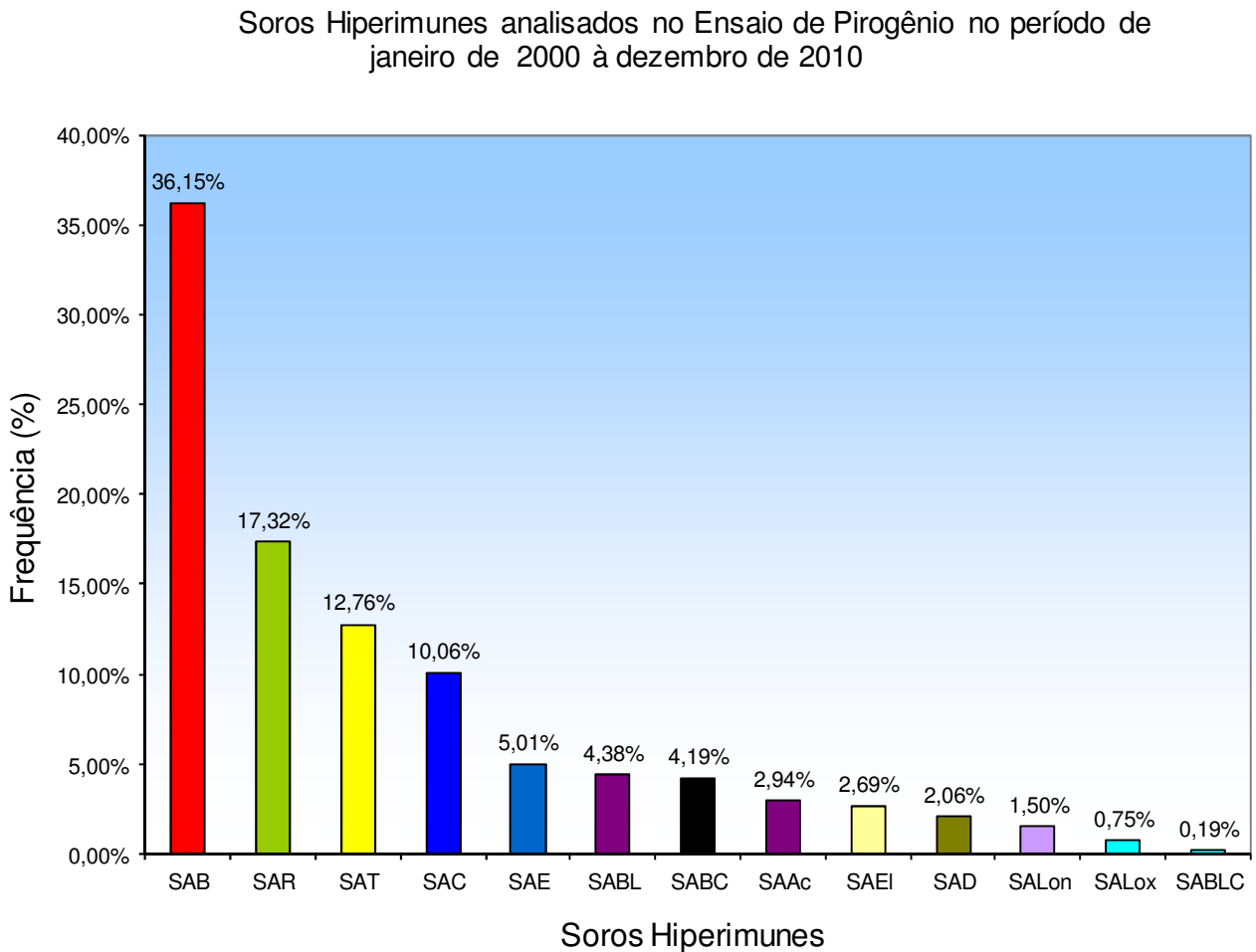
$Recuperação (\%) = (Concentração\ média\ experimental / Concentração\ teórica) \times 100$.

Para critérios de validação, a recuperação deve estar compreendida entre 80 – 120%.(ANVISA, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

Sistemas de Garantia da Qualidade como GMP, ISO 17025 exigem que os ensaios sejam validados para demonstrar que atendem ao seu objetivo de uso. A validação de um método (ensaio de LAL) alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos (FARMACOPÉIA Brasileira, 2004) proverá um método muito mais sensível para a detecção de endotoxinas em produtos injetáveis. No ensaio de pirogênio detecta-se endotoxinas a partir de 5 EU/mL, ao passo que, no ensaio de LAL, pelo método cromogênico cinético, endotoxinas podem ser detectadas em concentrações a partir de 0,005 EU/mL. Outro fator importante para justificar-se a validação do método para o soro antibotrópico é a necessidade cada vez maior de substituímos ensaios que utilizem animais (método *in vivo*) por testes *in vitro*. O soro antibotrópico foi escolhido para esta validação *in vitro* porque responde por cerca de 40% das amostras de soros hiperimunes que entram no INCQS para serem analisadas pelo ensaio *in vivo* de pirogênio em coelhos (Figura 3).

Figura 3. Frequência de análises de pirogênio realizadas pelo INCQS nos diferentes soros hiperimunes no período de 2000 a 2010 (SGA, 2010).



SAB - Soro antibotrópico

SAR- Soro antirrábico

SAT- Soro antitetânico

SAC- Soro anticrotático

SAE- Soro anti-escorpiônico

SABL- Soro antibotrópico-laquéutico

SABLC- Soro antibotrópico-laquéutico-crotático

SABC- Soro antibotrópico-crotático

SAAc- Soro anti-aracnídico

SAEL- Soro anti-elapídico

SAD- Soro antidiftérico

SALon- Soro antilonômico

SALox- Soro antiloxoscélico

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Validar o ensaio *in vitro* de LAL (método cromogênico cinético) para o soro antibiótico, em substituição ao clássico ensaio de pirogênio realizado em coelhos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Limite de Endotoxina (CLE) do soro antibiótico.

- Determinar a Máxima Diluição Válida (MDV) permitida para o soro antibiótico pelo método cromogênico cinético.

4 METODOLOGIA

4.1 Estudo de Validação

Qualificação Inicial - foi utilizado um Controle Padrão de Endotoxina (CSE) com as seguintes concentrações: 0,005 EU/mL; 0,05 EU/mL; 0,5 EU/mL; 5 EU/mL e 50 EU/mL. O ensaio foi realizado em triplicata, para cada concentração, juntamente com um controle negativo (água apirogênica), também em triplicata. Foram avaliados o coeficiente de correlação, coeficiente angular, interseção com o eixo Y e o coeficiente de variação de cada concentração utilizadas para a construção da curva padrão.

Inibição/Potencialização - o controle do produto contaminado ou *Spike* foi testado juntamente com o produto não contaminado. Foram testados 01 lote de soro de cada produtor (03 produtores), em triplicata, nas diluições de 1:10; 1:100 e 1:580 (MDV), juntamente com o controle negativo, em triplicata. Os lotes analisados foram: Produtor 01, lote nº 0907144/C; Produtor 02, lote nº 095112 B e Produtor 03, lote nº 08061024 A.

No ensaio de especificidade foram testados os lotes nº 0907144/C; 095112 B e 090127-02, em triplicata, na diluição de 1:10.

No ensaio de linearidade/curva padrão, foram testados os lotes nº 095103 G; 095105 A e 095106 G, em triplicata, na diluição de 1:10.

Para a validação da repetitividade (precisão intra-corrída) foram testados os lotes nº 0907144/B; 095105 B e 080610-24A, em triplicata, na diluição de 1:10.

No ensaio de precisão intermediária (precisão inter-corrídas) foram feitas 6 determinações, com seis repetições, em triplicata, na diluição de 1:10, sendo 3 determinações realizadas pelo analista 01 e 3 realizadas pelo analista 02, e em dias alternados. O lote utilizado foi o de nº 0905101/B.

Na exatidão do método foram realizadas 6 determinações, com seis repetições, em triplicata, na diluição de 1:10. O lote utilizado foi o de nº 0905101/B. A exatidão foi demonstrada através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente em cada determinação e a concentração teórica correspondente (0,5 EU/mL).

Em todos os experimentos desta validação, para cada teste, sempre foi utilizado um controle negativo (água apirogênica) e a construção de uma nova curva padrão, sempre em triplicata.

4.2 Procedimento experimental do ensaio LAL (método QCL-cinético)

Materiais/Equipamentos

- Água Reagente LAL (Lote n° 0000190713) (Cambrex®/LONZA);
- Tubos de vidro borossilicato apirogênicos;
- Solução tampão Tris Buffer (Cambrex®/LONZA);
- Micropipetas (10 µL, 20-200 µL e 200-1000 µL);
- Leitor de microplacas Elx808 IU (Bio-Tek Instruments, INC);
- Software WinKQCL® (Cambrex® versão 3.00);
- Cronômetro e agitador de tubos;
- Reagente LAL cromogênico (Lote n° KL070Q (Cambrex®/LONZA);
- Endotoxina padrão (E. coli 055:B5 - Lote n° 0000176397) (Cambrex®/LONZA);
- Lotes utilizados nos experimentos: 0907144/C; 095112/B; 08061024 A; 090127-02; 095103 G; 095105 A; 095106 G; 0907144/B. 095105 B e 0905101/B (Produzidos pelos três principais fabricantes do país).

Preparo do material

Os tubos de vidro utilizados nos testes foram tratados através do processo de despirogenização (INCQS- POP nº 65.3330.001, 2009) à 250°C por 30 minutos.

Preparo das soluções reagentes / Armazenamento

Reagente LAL:

O reagente LAL liofilizado (não reconstituído) foi armazenado sob refrigeração em temperaturas entre 2 e 8°C. O LAL foi reconstituído com água apirogênica (2,6

mL), antes de seu uso. Após a reconstituição, agitou-se vagorosamente para evitar a formação de bolhas. O reagente fica estável por 8 horas, quando armazenado em temperaturas entre 2 e 8°C, e estável por 4 semanas, quando armazenado em temperaturas inferiores a -10°C

Endotoxina *E. coli* 055:B5:

O volume de reconstituição da endotoxina, com água apirogênica, foi de 2,5 mL, tendo uma concentração final de 50 EU/ml. Após a reconstituição, agitou-se vigorosamente por 15 minutos no vórtex. A endotoxina reconstituída fica estável por 4 semanas entre 2 e 8°C. Ao realizar o ensaio, executou-se diluições seriadas (fator 10) a partir do padrão 50 EU/ml a fim de se obter as concentrações de endotoxina com 5 EU/ml; 0,5 EU/ml; 0,05EU/ml e 0,005EU/ml.

Preparo da amostra

O pH da amostra diluída (1:10) foi de 7. Entre uma diluição e outra, tanto da amostra, quanto da curva padrão de endotoxina, agitou-se cada solução em torno de 1 minuto no vortex

Preparo da placa teste

Colocou-se 100 µl do branco (água apirogênica), padrões de endotoxina (curva

padrão) e amostras nos poços da microplaca previamente determinados na configuração do programa de computador. O ensaio foi realizado em triplicata para garantir melhor precisão. Adicionou-se aos poços específicos para o CPP, 10µl da solução de 5 EU/ml, obtendo-se assim um CPP de 0,5 EU/mL. A microplaca foi específica para cada teste realizado, onde continha o nome do analista, tipo de ensaio, validade e número de lote dos reagentes, número e concentração dos padrões de endotoxina, número de replicatas e distribuição do branco, padrões e amostras na microplaca. A seguir, a microplaca foi colocada no leitor de microplacas e pré-incubada por um período de tempo \geq a 10 minutos à 37°C \pm 1°C. Ao final do período de pré-incubação, reconstitui-se cada frasco de reagente LAL e dispensou-se 100µL do reagente dentro de todos os poços da microplaca, começando pela primeira coluna (A1-H1) e procedendo em seqüência até a última coluna usada. O

tempo de leitura e término do ensaio variou de acordo com a concentração de endotoxina presente em cada amostra analisada.

Cálculo da Concentração Limite de Endotoxina (CLE) e Máxima Diluição Válida (MDV)

$$CLE = K / M$$

$K = 5 \text{ EU/kg}$ (é uma constante)

$M =$ é a dose humana máxima / kg de peso corporal, que pode ser administrado em um período de uma única hora, sendo utilizada a dose mais alta. Utilizou-se 120 mL (acidentes botrópicos extremos) de soro e 70 kg como sendo o peso médio humano.

$$CLE = 5 \text{ EU/kg} / 120 \text{ mL}/70 \text{ kg}$$

$$CLE = 2,9 \text{ EU/mL}$$

A MDV foi calculada pela fórmula abaixo:

$$MDV = CLE/\text{Ponto mais baixo da curva-padrão, logo } MDV = 2,9/0,005 = 580$$

4.3 Ensaio de Pirogênio.

Os procedimentos do ensaio foram realizados de acordo com o POP nº 65.3330.002 (INCQS, 2009). Foram analisados 10 lotes de soro antibotrópico produzidos pelos três principais produtores do país: 0907144/C; 095112/B; 08061024 A; 090127-02; 095103 G; 095105 A; 095106 G; 0907144/B; 095105 B e 0905101/B. Foram utilizados 03 (três) coelhos (ensaio inicial) para cada lote testado.

Os lotes analisados seguiram os critérios de aprovação descritos no POP nº 65.3330.002 (INCQS, 2009). Critérios estabelecidos: para que o produto seja considerado satisfatório, nenhum animal pode apresentar variação de temperatura $\geq 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em relação à temperatura inicial. Se o somatório do aumento das temperaturas dos (três) animais for superior a $3,3^{\circ}\text{C}$ o produto é considerado insatisfatório. Caso algum animal do ensaio inicial apresente variação de temperatura $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$, o ensaio é repetido com 05 (cinco) novos coelhos. O produto é

considerado satisfatório se no máximo 03 (três) dos oito animais apresentar variações individuais de temperatura $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$, ou se o somatório das variações de temperatura dos oito coelhos não for superior a $3,3^{\circ}\text{C}$. A dose do produto administrada por coelho foi de 1 mL/kg (INCQS-POP nº 65.3330.002, 2009)

Animais/Materiais/Equipamentos

- Coelhos adultos (mínimo de 1,5 kg), raça Nova Zelândia;
- Caixas de contenção de coelhos;
- Seringas descartáveis de 5 mL;
- Agulhas descartáveis de 25X7,0 mm;
- Algodão;
- EPIs (Luvas, Gorro, Jaleco, Sapatilhas e Máscaras);
- Sistema de monitoramento de temperatura Pyromon (Ellab).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos para a validação do ensaio de endotoxina bacteriana (LAL) para o produto soro antibotrópico demonstraram que todos os parâmetros de desempenho do protocolo de validação foram alcançados.

No ensaio referente à qualificação inicial, os resultados obtidos satisfazem a condição exigida para a validação (Tabela 1): coeficiente de correlação = -0,998 (-1,00 a -0,998); coeficiente angular = -0,234 (-0,400 a -0,100) e interseção com o eixo Y = 2,948 (2,500 a 3,500) (Quadro12).

Tabela 1- Ensaio de Qualificação Inicial: Curva padrão de endotoxina bacteriana.

Curva-padrão de endotoxina (CSE¹) (EU/mL)²	CV³(%)	Especificação
0,005	3,71	< 10%
0,05	0,65	< 10%
0,5	0,87	< 10%
5	1,99	< 10%
50	2,68	< 10%
Branco	Não reativo	

¹Controle padrão de endotoxina; ²Unidades de endotoxina; ³Coefficiente de variação.

Quadro 12 – Resultados da Curva-Padrão

Parâmetros da curva	Resultados	Especificações
Coeficiente de Correlação	-0,998	-1,000 a -0,980
Coeficiente angular	-0,234	-0,400 a -0,100
Interseção com o eixo Y	2,948	2,500 a 3,500

No teste de inibição-potencialização para três lotes de SAB (Tabelas 2, 3 e 4) observa-se que as recuperações do CPP nas diluições de 1:10, 1:100 e 1:580 estão de acordo com o que está preconizado pelo Food and Drug Administration (FDA) e Farmacopéia Americana (USP) para o ensaio de endotoxina bacteriana (LAL). A recuperação deve estar compreendida entre 50 a 200%. Optamos por trabalhar com a diluição de 1:10, visto que, o FDA e a USP não recomendam trabalhar próximo ou na MDV (580) e a diluição de 1:100 só permite quantificar concentrações de endotoxina, presente no produto, a partir de 0,5 EU/mL, sendo observado em nosso estudo que a maioria das concentrações encontradas nas amostras estavam abaixo desse valor. Porém, em um ensaio de rotina essa diluição (1:100) pode ser empregada, já que, a CLE \leq 2,9 EU/mL. Portanto, na diluição de 1:10, a quantificação de endotoxina se dá a partir de 0,05 EU/mL atendendo perfeitamente ao nosso propósito, visto que, a quantificação da concentração de endotoxina no produto se fez necessária para a avaliação da precisão e exatidão do ensaio.

Tabela 2 - Ensaio de Inibição/Potencialização. Produtor 01: lote nº 0907144/C.

Diluição SAB¹	CV (%)	Recuperação (%)	Especificação (%)	Endotoxina (EU/mL)
1:1	----	Inválida	50 a 200	-----
1:10	0,61	90	50 a 200	< 0,05
1:100	0,71	101	50 a 200	< 0,5
1:580	1,55	151	50 a 200	< 2,9

Coeficiente de correlação: -0,997; Coeficiente angular: -0,229; Interseção com Y: 2,970

¹Soro antibotrópico

Tabela 3 - Ensaio de Inibição/Potencialização. Produtor 02: lote n° 095112 B.

Diluição SAB¹	CV (%)	Recuperação (%)	Especificação (%)	Endotoxina (EU/mL)
1:1	----	Inválida	50 a 200	-----
1:10	1,31	71	50 a 200	0,139
1:100	0,33	85	50 a 200	< 0,5
1:580	5,36	161	50 a 200	< 2,9

Coeficiente de correlação: -0,997; Coeficiente angular: -0,242; Interseção com Y: 2,947

¹Soro antibotrópico

Tabela 4 - Ensaio de Inibição/Potencialização. Produtor 03: lote n° 08061024 A.

Diluição SAB¹	CV (%)	Recuperação (%)	Especificação (%)	Endotoxina (EU/mL)
1:1	----	Inválida	50 a 200	-----
1:10	0,73	74	50 a 200	0,145
1:100	0,98	85	50 a 200	< 0,5
1:580	5,36	194	50 a 200	< 2,9

Coeficiente de correlação: -0,997; Coeficiente angular: -0,205; Interseção com Y: 2,946

¹Soro antibotrópico

No teste de especificidade foram testados três lotes do produto (Tabela 5) onde não houve reação do controle negativo (branco) em presença do reagente LAL. O lote 0907144/C em presença do reagente LAL detectou uma baixa concentração de endotoxina (< 0,05 EU/mL) e nenhuma impureza ou metabólitos que pudessem mascarar o teste. Em paralelo, foram testados os lotes 095112 B e 090127-02 com a detecção respectivamente de 0,139 EU/mL e 0,0827 EU/mL, comprovando que apenas endotoxina é detectada e quantificada pelo método LAL QCL-cinético.

Tabela 5 - Validação do LAL método cromogênico cinético: Especificidade / Seletividade.

SAB¹ Lote	Diluição	Recuperação (%)	Endotoxina (EU/mL)	Branco
0907144/C	1:10	84	< 0,05	Não reativo
095112 B	1:10	71	0,139	Não reativo
090127-02	1:10	106	0,0827	Não reativo

Coeficiente de correlação: -0,998; Coeficiente angular: -0,214; Interseção com Y: 2,968

¹Soro antibotrópico

A linearidade foi comprovada através do ensaio de três lotes do produto respectivamente, 095103 G, 095105 A e 095106 G (Tabela 6). Os valores encontrados satisfazem os critérios de validação, com o coeficiente de correlação igual a -0,998, coeficiente angular igual a -0,263 e interseção com eixo Y igual a 2,915.

Tabela 6 - Validação do LAL-método cromogênico cinético: Linearidade / Curva-padrão.

Lote SAB¹	Diluição.	Coeficiente de Correlação.	Coeficiente Angular	Interseção com Y	Recuperação	Endotoxina (EU/mL)
095103 G	1:10	-0,998	-0,263	2,915	68%	0,479
095105 A	1:10	-0,998	-0,263	2,915	69%	1,33
095106 G	1:10	-0,998	-0,263	2,915	130%	0,119

¹Soro antibotrópico

O ensaio também apresentou uma ótima repetitividade (precisão intra-corrída) através de experimento realizado em três lotes, 0907144/B, 095105 B e 080610-24 A, com um C.V. de 1,40%; 3,16% e 3,88%, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 - Validação do LAL - método cromogênico cinético: Repetitividade (precisão intra-corrída).

Lote SAB¹	Tempo de Reação (seg)	Média do tempo de reação (seg)	Desvio Padrão	C.V. (%)	Especificação
0907144/B	646	654	9,16	1,40	< 10%
	664				
	652				
095105 B	664	678	21,4	3,16	< 10%
	703				
	668				
080610-24A	643	633	24,5	3,88	< 10%
	605				
	651				

Coeficiente de correlação: -0,998; Coeficiente angular: -0,231; Interseção com Y: 3,003

¹Soro antibotrópico

A precisão intermediária (precisão inter-corrídas) do método foi comprovada através de 6 (seis) determinações do lote 0905101/B (Tabelas 8 e 10). Cada analista efetuou 3 (três) determinações em dias alternados. O analista 01 obteve C.V. de 12,6%; 5,6% e 9,6% e o analista 02 obteve C.V. de 13,8%; 9,9% e 11,4%. As 6 determinações obtidas atendem ao critério estabelecido pela ANVISA para a comprovação de precisão de método bioanalítico que prediz um C.V. < 15%.

Tabela 8 - Validação do LAL - método cromogênico cinético: Precisão intermediária (precisão inter-corridas) - Analista 01: Soro antibotrópico Lote n° 0905101/B.

Determinação 01	Determinação 02	Determinação 03
Endotoxina (EU/mL)	Endotoxina (EU/mL)	Endotoxina (EU/mL)
0,183	0,215	0,0648
0,210	0,192	0,0782
0,195	0,189	0,0676
0,149	0,188	0,0620
0,190	0,207	0,0613
0,215	0,190	0,0724
Média = 0,190	Média = 0,197	Média = 0,0677
D.P. = 0,024	D.P. = 0,011	D.P. = 0,0065
C.V. = 12,6%	C.V. = 5,6%	C.V. = 9,6%

Tabela 9 - Parâmetro da Curva padrão – Precisão intermediária (precisão inter-corridas) - Analista 01.

Determinação 01	Determinação 02	Determinação 03
Coef. Correl. = - 0,998	Coef. Correl. = - 0,995	Coef. Correl. = - 0,996
Coef. Angular = - 0,232	Coef. Angular = - 0,241	Coef. Angular = - 0,238
Inters. com Y = 3,041	Inters. com Y = 3,026	Inters. com Y = 3,031

Tabela 10 - Validação do LAL-método cromogênico cinético: Precisão intermediária (precisão inter-corridas) - Analista 02: Soro antibotrópico Lote n° 0905101/B.

Determinação 01	Determinação 02	Determinação 03
Endotoxina (EU/mL)	Endotoxina (EU/mL)	Endotoxina (EU/mL)
0,0888	0,122	0,0565
0,0765	0,122	0,0466
0,0649	0,119	0,0463
0,0964	0,144	0,0613
0,0921	0,109	0,0516
0,0819	0,112	0,0496
Média = 0,0834	Média = 0,121	Média = 0,0519
D.P. = 0,0115	D.P. = 0,012	D.P. = 0,0059
C.V. = 13,8%	C.V. = 9,9%	C.V. = 11,4%

Tabela 11- Parâmetros da Curva padrão - Precisão intermediária (precisão inter-corridas) - Analista 02.

Determinação 01	Determinação 02	Determinação 03
Coef. Correl. = - 0,995	Coef. Correl. = - 0,998	Coef. Correl. = - 0,997
Coef. Angular = - 0,243	Coef. Angular = - 0,237	Coef. Angular = - 0,236
Inters. com Y = 3,023	Inters. com Y = 3,021	Inters. com Y = 3,054

A exatidão do método foi comprovada através de 6 (seis) determinações do lote 0905101/B (Tabelas 12 e 14). A amostra foi fortificada (*spike*) com 0,5 EU/mL para a verificação da porcentagem de recuperação da quantidade do analito adicionado. A exatidão foi demonstrada através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente em cada determinação e a concentração teórica correspondente (0,5 EU/mL). Nas seis determinações realizadas foram obtidos os seguintes percentuais de recuperação (%): 103,2%; 103,2%; 110,6%; 114,4%; 103,8% e 90,7%. A ANVISA determina para critérios de validação de método bioanalítico que a recuperação esteja compreendida entre 80% e 120%.

Tabela 12 - Validação do LAL- método cromogênico cinético: Exatidão - Soro antibotrópico Lote n° 0905101/B.

Determinação 01	Determinação 02	Determinação 03
Endotoxina (EU/mL) / % de recuperação	Endotoxina (EU/mL) / % de recuperação	Endotoxina (EU/mL) / % de recuperação
0,410 / 82	0,412 / 83	0,439 / 88
0,559 / 112	0,576 / 115	0,598 / 120
0,512 / 102	0,506 / 101	0,568 / 114
0,486 / 97	0,491 / 98	0,552 / 110
0,481 / 96	0,480 / 96	0,517 / 103
0,647 / 129	0,633 / 127	0,643 / 129
Média = 0,516	Média = 0,516	Média = 0,553
Recuperação = 103,2%	Recuperação = 103,2%	Recuperação = 110,6%

Tabela 13 - Parâmetros da Curva padrão – Exatidão.

Determinação 01	Determinação 02	Determinação 03
Coef. Correl. = - 0,998	Coef. Correl. = - 0,995	Coef. Correl. = - 0,996
Coef. Angular = - 0,232	Coef. Angular = - 0,241	Coef. Angular = - 0,238
Inters. com Y = 3,041	Inters. com Y = 3,026	Inters. com Y = 3,031

Tabela 14 - Validação do LAL- método cromogênico cinético: Exatidão (continuação)
 - Soro antibiótico Lote n° 0905101/B.

Determinação 01	Determinação 02	Determinação 03
Endotoxina (EU/mL) / % de recuperação	Endotoxina (EU/mL) / % de recuperação	Endotoxina (EU/mL) / % de recuperação
0,455 / 91	0,380 / 76	0,485 / 97
0,575 / 115	0,606 / 121	0,457 / 91
0,612 / 122	0,523 / 105	0,378 / 76
0,585 / 117	0,509 / 102	0,497 / 99
0,582 / 116	0,432 / 86	0,470 / 94
0,622 / 124	0,662 / 132	0,434 / 87
Média = 0,572	Média = 0,519	Média = 0,453
Recuperação = 114,4%	Recuperação = 103,8%	Recuperação = 90,7%

Tabela 15 - Parâmetros da Curva padrão – Exatidão (continuação).

Determinação 01	Determinação 02	Determinação 03
Coef. Correl. = - 0,995	Coef. Correl. = - 0,998	Coef. Correl. = - 0,997
Coef. Angular = - 0,243	Coef. Angular = - 0,237	Coef. Angular = - 0,236
Inters. com Y = 3,023	Inters. com Y = 3,021	Inters. com Y = 3,054

A concentração limite de endotoxina (CLE) calculada teoricamente, comprovou na prática ser uma concentração limite apropriada para detecção de endotoxina no soro antibiótico. Em todos os experimentos as concentrações de endotoxina encontradas durante toda a validação demonstraram ser inferiores a CLE, ou seja, 2,9 EU/mL.

Os lotes do produto soro antibiótico utilizados na validação do método LAL QCL-cinético foram também ensaiados no teste de pirogênio. Os resultados obtidos demonstram o comportamento do produto frente ao ensaio *in vitro* e *in vivo* (Quadro 13). O somatório de variação de temperatura, para cada ensaio de pirogênio realizado, ficou na faixa de 0,05°C a 0,85°C, e a concentração de endotoxina no ensaio *in vitro* na faixa de 0,08 a 1,33 EU/mL. Todas as amostras satisfatórias *in vivo* seriam também aprovadas pelo ensaio *in vitro*. Para dois lotes, as concentrações de endotoxina foram inferiores a 0,05 EU/mL.

Quadro 13 - Resultados dos Ensaio de LAL(método cromogênico cinético) e Teste de Pirogênio em amostras de soro antibotrópico (SAB).

Lote SAB¹	Ensaio do LAL Endotoxina (EU/mL)	Teste de Pirogênio Variações de temperatura/ somatório
0907144/C	< 0,05	(0,00; 0,05; 0,00) $\Sigma= 0,05^\circ\text{C}$
095112/B	0,139	(0,10; 0,00; 0,10) $\Sigma= 0,20^\circ\text{C}$
08061024 A	0,145	(0,05; 0,00; 0,10) $\Sigma= 0,15^\circ\text{C}$
090127-02	0,0827	(0,15; 0,00; 0,20) $\Sigma= 0,35^\circ\text{C}$
095103 G	0,479	(0,40; 0,10; 0,35) $\Sigma= 0,85^\circ\text{C}$
095105 A	1,33	(0,25; 0,00; 0,20) $\Sigma= 0,45^\circ\text{C}$
095106 G	0,119	(0,30; 0,10; 0,05) $\Sigma= 0,45^\circ\text{C}$
0907144/B	<0,05	(0,00; 0,00; 0,05) $\Sigma= 0,05^\circ\text{C}$
095105 B	0,285	(0,00; 0,00; 0,15) $\Sigma= 0,15^\circ\text{C}$
0905101/B	0,118 *	(0,10; 0,10; 0,10) $\Sigma= 0,30^\circ\text{C}$

* Média das 06(seis) determinações dos experimentos empregada na avaliação da precisão.

¹Soro antibotrópico

6 CONCLUSÃO

- 1- O ensaio de LAL pelo método cromogênico cinético foi considerado válido para a determinação de endotoxina bacteriana em amostras de soro antibiótico, visto que, atendeu aos parâmetros de desempenho descritos no protocolo da validação.
- 2- O valor da Concentração Limite de Endotoxina do soro antibiótico foi estabelecida como sendo \leq a 2,9 EU/mL.
- 3- A Máxima Diluição Válida para o soro antibiótico foi de 1:580
- 4- Recomendamos a diluição de 1:10 do soro antibiótico no ensaio de rotina para a determinação de endotoxina, embora qualquer diluição abaixo da Máxima Diluição Válida (MDV) possa ser utilizada.

7 PERSPECTIVAS

Com a validação alcançada, submeteremos o trabalho para a avaliação da Farmacopéia Brasileira para que possa ser inserido como um ensaio *in vitro* para o controle de qualidade do produto soro antibotrópico, que atualmente é realizado em animais (coelhos). Será elaborado também o Procedimento Operacional Padronizado (POP) para a realização do ensaio no INCQS.

A partir da validação do método do LAL cromogênico cinético para o soro antibotrópico, poderemos validar os demais soros hiperimunes atendendo ao Princípio dos 3 Rs. Em paralelo, iremos correlacionar a atual validação do ensaio de endotoxina bacteriana (LAL) para o soro antibotrópico, pelo método cromogênico cinético, com a validação de outros produtos que já estejam inseridos nas Farmacopéias Americana e Européia.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Brasília, DF, 2003.

A CAMREX COMPANY. LAL test made easy: Kinetic-QCL, catalog No. 50-650U, license No. 709, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração, Rio de Janeiro: 2001.

BALLS, M.; VAN ZELLER, A-M.; HALDER, M. **Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation**. Amsterdam: Elsevier, 2000.

CANTER, H.M.C.; Perez Junior, J.A.; HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.R. **Soros e vacinas**. São Paulo: Instituto Butantan, 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_2/SorosVacinas/index.htm>. Acesso em: 14/2/2011.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, 2004.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. Parte II fascículo 5. São Paulo; Atheneu, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices**. Washington, 1992.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. **Soros produzidos/Bulas**. Belo Horizonte, 2009. Disponível em: <<http://www.funed.mg.gov.br/produtoseservicos/produtos-imunologicos/soros-produzidos-bulas-1-34k>>. Acesso em: 21 maio 2009.

INFORMAÇÃO para os profissionais de saúde: Portal da Saúde, Brasil. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.portal.saude.gov.br/profissionais-ofidismo>>. Acesso em: 17 set. 2009

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Ensaio de Pirogênio**. Procedimento Operacional Padronizado nº 65.3330.002, Rev.08, Rio de Janeiro, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Orientação Para Validação De Métodos Analíticos**. Procedimento Operacional Padronizado nº 65.1120.065, Rev. 00, Rio de Janeiro, 2007.

INSTITUTO BUTANTAN. **Bulas [online]**. Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/htm>>. Acesso em: 25 maio 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA)**. Rio de Janeiro, 2010. Base de dados.

INSTITUTO VITAL BRAZIL. **Vacinas/Soros. [on line]**. São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.vacinas.org.br/novo/soros-heterologos/antibotrópico.htm>>. Acesso em 21 maio 2009.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. Campinas. Ed. Átomo, 1998.

LEVIN, J.; BANG. F. B. A description of cellular coagulation in the Limulus. **Bull. Johns Hopkins Hosp.**, p. 115-337, 1964.

LIMA, A. C. S. F. L.; CAMPOS. C. E. C.; RIBEIRO, J. R. Perfil epidemiológico de acidentes ofídicos do Estado do Amapá. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 329-335, jun. 2009.

LUCIANO, P. M.; SILVA, G. E B.; MARQUES, M. M. A. **Acidente botrópico fatal**. Relato de caso. Ribeirão Preto: USP, 2009. p. 61-65.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Bolso. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Acidentes por Animais Peçonhentos**. 7 ed. Brasília, D.F., p. 28-37, 2008.

MORALES, R. P. Ensayo del lisado de amebócitos del Limulus (LAL). **Revista Cubana de Farmácia**, v. 38, n. 1, p. 1-8, 2004.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo: Artigo de Revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

ROJAS, C. A.; GONÇALVES, M. R.; SANTOS, S. M. Epidemiologia dos acidentes ofídicos na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, p.193-204, 2007.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH. R. L. **The principles of humane experimental Technique**. Methuen, London, 1959.

SINITOX . Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamentos. Brasil, 2005. Rio de Janeiro; FIOCRUZ, 2006. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sintox/>>. Acesso em: 21 maio 2009.

STEPHENS, M. L.; GOLDBERG, A. M.; ROWAN, A. N. **The first forty years of the alternatives approach**: refining, reducing, and replacement the use of laboratory

animals. In: ROWAN, N. A. The state of the animals. Washington: Human Society Press, 2001. Chapter 8.

THE UNITED STATE PHARMACOPOEIA. **Bacterial Endotoxin Test**. In: USP 32 / NF 27. Rockville, U.S. Pharmacopeia, 2009.

THE UNITED STATE PHARMACOPOEIA, **Validation of compendial procedures <1225>**. In: USP 32 / NF 27. Rockville, U.S. Pharmacopeia, 2009. v.1, p.734.

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

WILLIAMS, K. L. **Endotoxins**. 3 ed. New York: Informa Healthcare, 2007.