

Análise do Impacto do Volume no Ensaio de Detecção de Endotoxina Bacteriana

Isabely da S. Moura¹; Melissa R. S. Cibien¹; Ana Beatriz C. da Silva¹; Ingrid dos S da Silva¹; Isaque B. de Oliveira¹; Marcus Vinicius de M. da Silva¹; Hendro F. de Farias²; Alessandra V. Pereira²; Camila da S. Quidorne¹;

¹Laboratório de Metrologia -Vice-Diretoria de Gestão da Qualidade - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS - Fiocruz)

²Setor de Irritação Pirogênio e LAL – Departamento de Farmacologia e Toxicologia – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS – Fiocruz)

isabely.moura@fiocruz.br

INTRODUÇÃO

O ensaio de detecção de endotoxina bacteriana, também conhecido como ensaio LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*), é uma técnica amplamente utilizada para detectar a presença de endotoxinas, que são componentes tóxicos encontrados na parede celular de certas bactérias gram-negativas. O *Limulus polyphemus* (caranguejo-ferradura) produz um lisado de amebócitos que contém uma enzima, chamada coagulase, que é ativada na presença de endotoxinas.

Dentre os equipamentos utilizados no ensaio do LAL, a micropipeta é usada para avolumar as amostras e os reagentes. Este ensaio foi avaliado através de uma auditoria externa para manutenção da acreditação, na qual foi indagado sobre a criticidade do volume de reagentes transferidos pelas micropipetas. A tolerância definida no POP 65.3330.006 rev.15 para aceitar este instrumento como apto para o uso neste ensaio, considera-se que a incerteza seja menor que 10% do valor nominal (tolerância = valor de incerteza \leq 10% do valor nominal). Não evidenciando o impacto do erro de medição apresentado no certificado de calibração, apenas a incerteza como parâmetro.

OBJETIVO

Apresentar um estudo da análise do potencial impacto do volume no resultado do ensaio de detecção de endotoxina bacteriana em produtos parenterais.

METODOLOGIA

Para cada novo lote do reagente LAL ou da endotoxina padrão é necessário confirmar a sensibilidade declarada do reagente, essa confirmação é uma etapa prévia à utilização de cada novo lote na rotina de análise para vigilância sanitária.

Foi realizado um levantamento retrospectivo dos resultados de confirmação da sensibilidade do LAL dos anos 2021, 2022 e 2023. Foram utilizados 3 lotes de reagente e as respectivas micropipetas utilizadas, conforme Quadro 1.

Quadro 1 – Protocolo para confirmação da Sensibilidade do LAL.

Protocolo para confirmação da Sensibilidade o LAL							
Data de realização do ensaio	Lote do LAL	Lote da Endotoxina	Lote da água	Fabricante	Data da validação	Data da Despirogenização	Pipetas Usadas
25/06/2021	0000790462	0000813548	0000971404	LONZA	25/06/2021	24/06/2021	<input checked="" type="checkbox"/> V2226 <input checked="" type="checkbox"/> V3017 <input checked="" type="checkbox"/> V1495 <input checked="" type="checkbox"/> V0875 <input checked="" type="checkbox"/> V0874 <input checked="" type="checkbox"/> V2267
21/09/2022	0001007644	0000867343	0001039616	LONZA	21/09/2022	21/09/2022	<input checked="" type="checkbox"/> V2226 <input checked="" type="checkbox"/> V3017 <input checked="" type="checkbox"/> V1495 <input checked="" type="checkbox"/> V0875 <input checked="" type="checkbox"/> V0879 <input checked="" type="checkbox"/> V2267 <input checked="" type="checkbox"/> V0874
10/01/2023	0001007644	0000867343	0001039616	LONZA	10/01/2023	10/01/2023	<input checked="" type="checkbox"/> V2226 <input checked="" type="checkbox"/> V3017 <input checked="" type="checkbox"/> V1495 <input checked="" type="checkbox"/> V0875 <input checked="" type="checkbox"/> V0879 <input checked="" type="checkbox"/> V2267 <input checked="" type="checkbox"/> V0874

Fonte: POP 65.3330.006 rev.15.

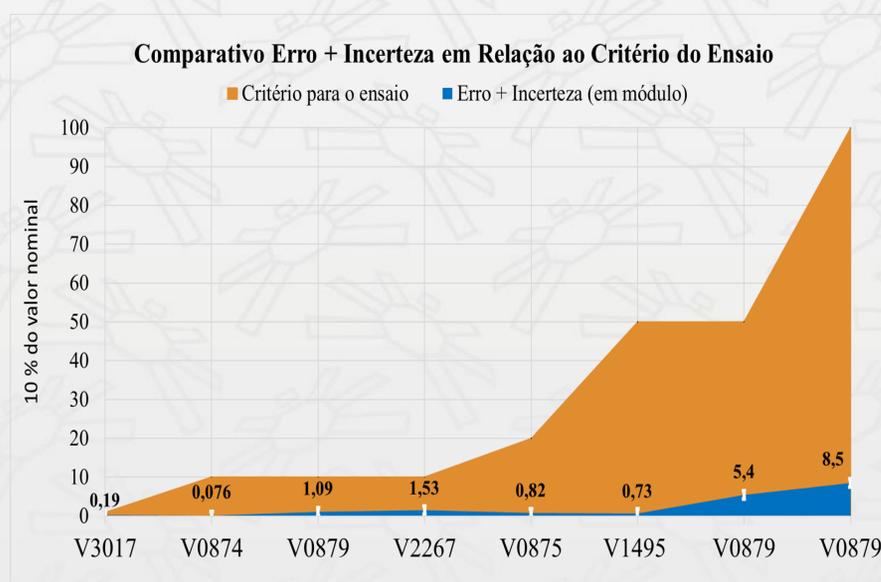
A Tabela 1 - demonstra os valores nominais, seus respectivos erros e incertezas para cada micropipeta utilizada nos ensaios descritos no Quadro 1.

Tabela 1 – Tabela com dados do certificado de calibração e critério de ensaio.

Certificado	Código das micropipetas	Volume Nominal (μL)	Valor medido (μL)	Erro (μL)	Incerteza (μL)	Critério para o ensaio (de acordo com o POP 65.3330.006)
V01069-2022	V1495	500	499,75	-0,25	0,48	Incerteza \leq 10% do valor nominal
V00082-2023	V0874	100	100,016	0,02	0,06	Incerteza \leq 10% do valor nominal
V00083-2023	V3017	10	9,92	-0,08	0,11	Incerteza \leq 10% do valor nominal
V01066-2022	V0875	200	199,67	-0,33	0,49	Incerteza \leq 10% do valor nominal
		100	100,31	0,31	0,78	Incerteza \leq 10% do valor nominal
V01305-2022	V0879	500	496	-4	1,4	Incerteza \leq 10% do valor nominal
		1000	993,6	-6,4	2,1	Incerteza \leq 10% do valor nominal
V01072-2022	V2267	100	99,46	-0,54	0,99	Incerteza \leq 10% do valor nominal

Fonte: Certificado de calibração das micropipetas analisadas e POP 65.3330.006 rev.15.

A soma, em módulo, dos valores de incerteza e erro são inferiores ao critério estabelecido no referido POP, como demonstrado no gráfico abaixo.



CONCLUSÃO

Portanto, ao realizar o teste de sensibilidade foi possível detectar a presença da endotoxina com as alíquotas transferidas por cada micropipeta sem realizar o ajuste do erro. Destaca-se que os controles positivo e negativo foram utilizados para validar a presença e a ausência de endotoxina.

Através do histórico de análises de sensibilidade do reagente, foi possível observar que, mesmo não corrigindo o erro de medição apresentado nos respectivos certificados de calibração das micropipetas relacionadas, o teste de sensibilidade apresentou o padrão de confirmação estipulado pelo fabricante, validando sua sensibilidade. Desta forma, conclui-se que a variação de até 10% dos volumes pipetados, conforme preconizado no método, não interfere na confiabilidade do resultado analítico.