



TESTES DE PIROGÊNIO E ENDOTOXINA BACTERIANA

Felipe Rebello Lourenço

Setembro/2018

HISTÓRICO

- Panum: elevação da temperatura (febre) a partir de substâncias pútridas, termoeestáveis e solúveis em água.
- Billbroth: introduziu o termo *pyrogen*. Produção de hipertermia em cachorros pela injeção de água destilada.
- Burdon-Sanderson: agente exógeno (pirogênios) e agente endógeno.

HISTÓRICO

★ Século XIX

- Pelletier e Caventue: isolamento da quinina (antipirético).
- Centanni: isolamento de toxina bacteriana responsável pela ação febril (endotoxina).

HISTÓRICO

☀ Século XX

- Hort e Penfold: febre associada a administração parenteral (“febre das injeções”).
- Seibert (1923): febre decorrente de pirogênios filtráveis, termoestáveis, produzidos por Bactérias Gram-negativas.



CONCEITO IMPORTANTE

ESTERILIDADE

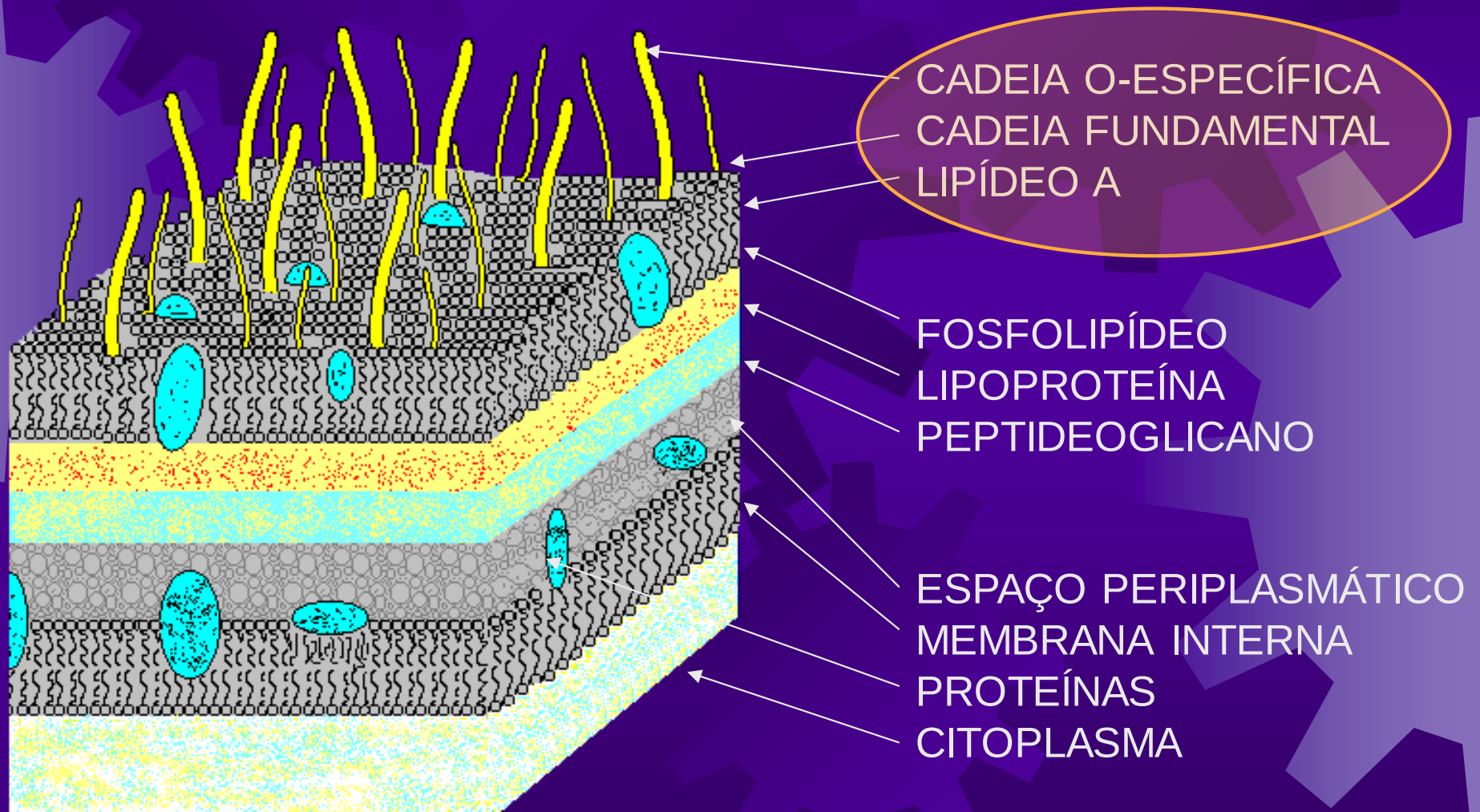
X

APIROGENICIDADE

FONTES DE PIROGÊNIO

- ✱ Bactérias Gram-positivas
- ✱ Fungos
- ✱ Vírus
- ✱ Fármacos
- ✱ Bactérias Gram-negativas - LPS

MORFOLOGIA MICROBIANA



ESTRUTURA DO LPS

CADEIA O-ESPECÍFICA

CADEIA FUNDAMENTAL

LIPÍDEO A

Seqüência de
açúcares

Polissacarídeo

Fosfolipídeo

↓
Ação biológica



DESPIROGENIZAÇÃO

POR INATIVAÇÃO

X

POR REMOÇÃO

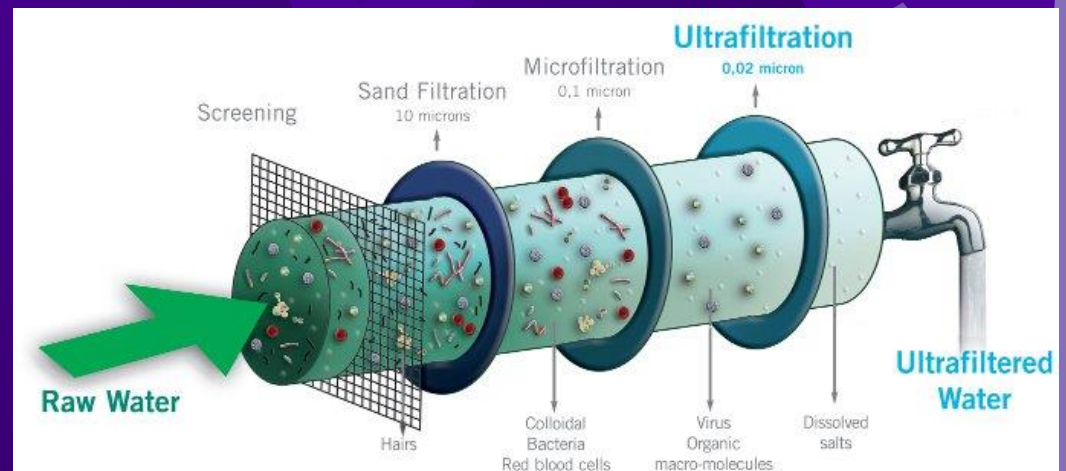
DESPIROGENIZAÇÃO POR INATIVAÇÃO



- ✦ Hidrólise ácido/base
- ✦ Oxidação/Alquilação
- ✦ Radiação Ionizante
- ✦ Calor Seco

DESPIROGENIZAÇÃO POR REMOÇÃO

- ☀ Lavagem
- ☀ Atração Eletrostática
- ☀ Ultrafiltração



DETECÇÃO DE ENDOTOXINAS

MÉTODO *IN VIVO*

X

MÉTODO *IN VITRO*



PIROGÊNIO *IN VIVO*

EFEITOS DO PIROGÊNIO

- ✱ Pirogênio exógeno atua no centro termorregulador do hipotálamo
- ✱ Leucócitos fagocitários liberam pirogênio endógeno
- ✱ Aumento da temperatura corpórea (febre)
Choque pirogênico (morte)

PIROGÊNIO *IN VIVO*

- ★ Elevação de temperatura de coelhos após administração intravenosa da solução teste, provocada pela presença de pirogênio
- ★ Limitações: Alta variabilidade, falso positivo, fármacos antipiréticos, tóxicos e outros
- ★ Efeito bifásico de febre:
 - ★ Pirogênio exógeno: 1 hora
 - ★ Pirogênio endógeno: 3 horas

PIROGÊNIO *IN VIVO*

- ☀ Pré-teste: verificar temperatura dos coelhos (variação $< 1^{\circ}\text{C}$)
- ☀ Administração intravenosa da amostra pré-aquecida a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- ☀ Registrar temperatura a cada 30 minutos por 3 horas



PIROGÊNIO *IN VIVO*

☀ Interpretação

☀ 1º etapa:

3 coelhos

Nenhum $\uparrow$ temperatura $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$

☀ 2ª etapa:

+ 5 coelhos (8 total)

Não mais que 3 $\uparrow$ temperatura $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$

Soma $\uparrow$ temperatura $\leq 3,3^{\circ}\text{C}$



MÉTODOS *IN VITRO*

MÉTODO *IN VITRO*

- ☀ 1885: Sangue do caranguejo *Limulus polyphemus* apresentava formação de coágulo em gel, associada a doenças provocadas por bactérias marinhas (Gram-negativas).
- ☀ Levin e Bang: lise dos amebócitos do caranguejo acelerava a reação de formação de gel.
- ☀ LAL: Lisado dos Amebócitos do *Limulus*

REAGENTE LAL



MÉTODOS DE ENSAIO

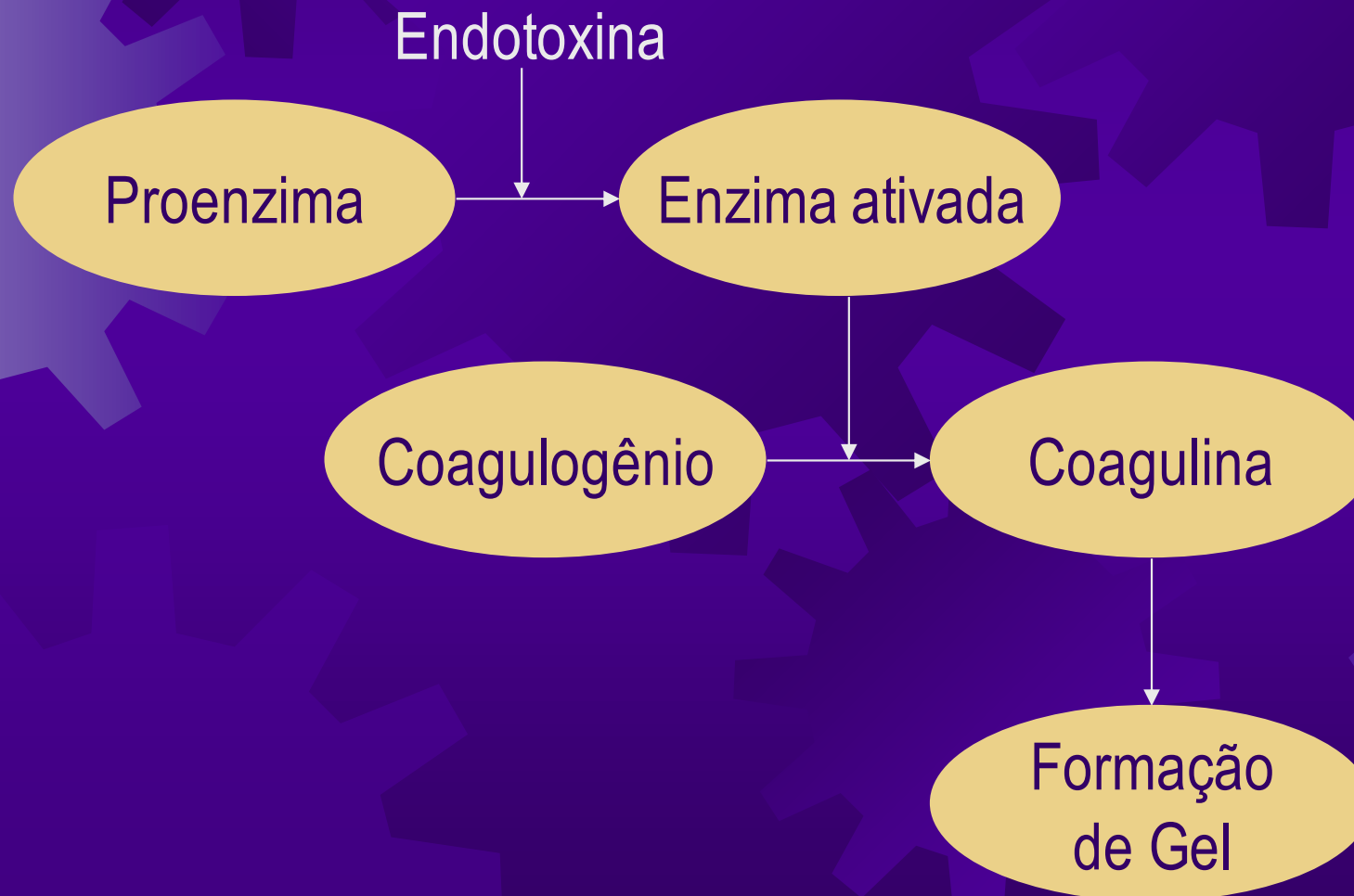
- ✱ Gel-Clot (End-Point)
- ✱ Cromogênico (End-Point)
- ✱ Cromogênico (Kinetic)
- ✱ Turbidimétrico (End-Point)
- ✱ Turbidimétrico (Kinetic)



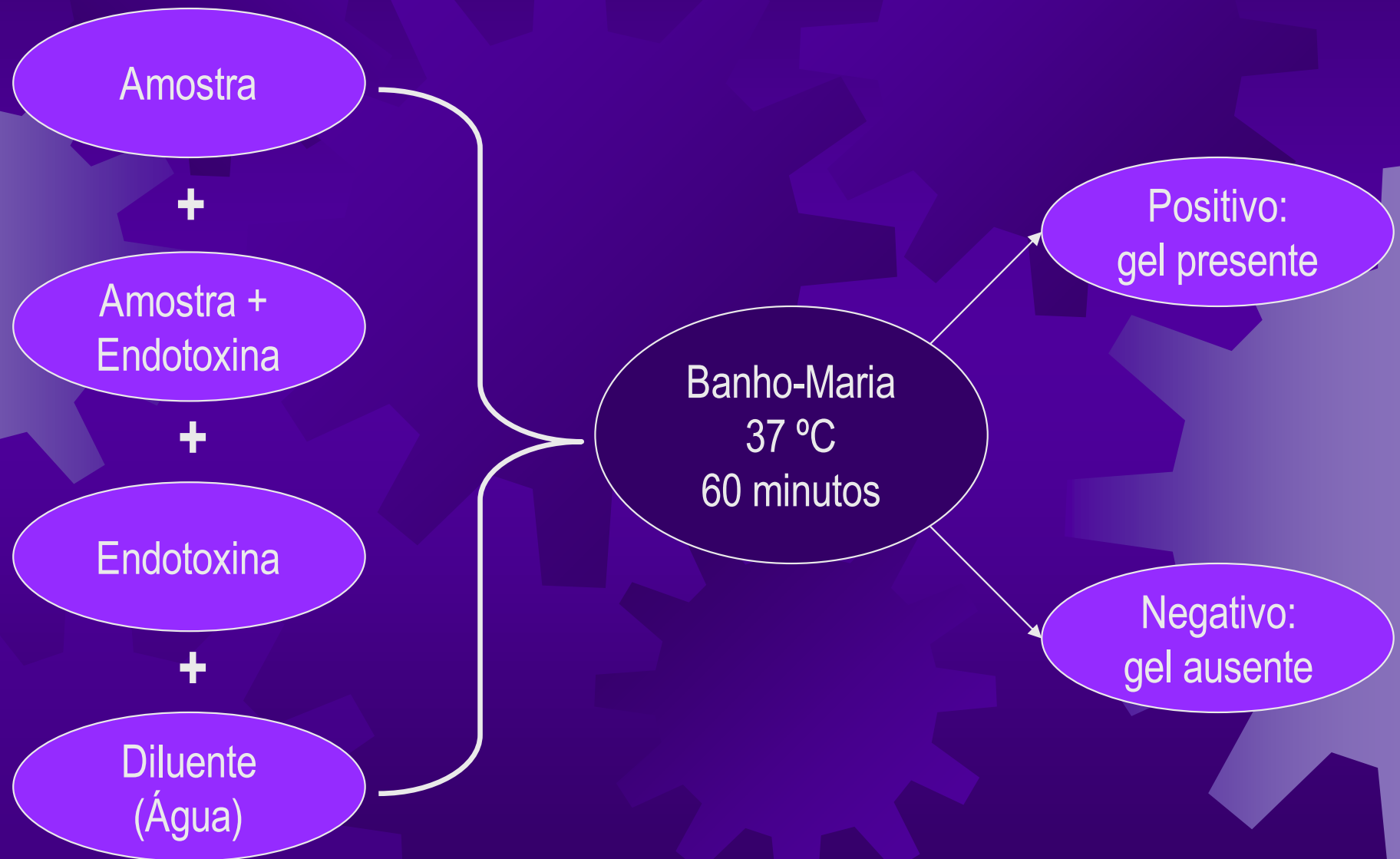
MÉTODO DE GELIFICAÇÃO

GEL-CLOT

☀ Mecanismo de Reação



CONDIÇÕES DO TESTE



MÁXIMA DILUIÇÃO VÁLIDA

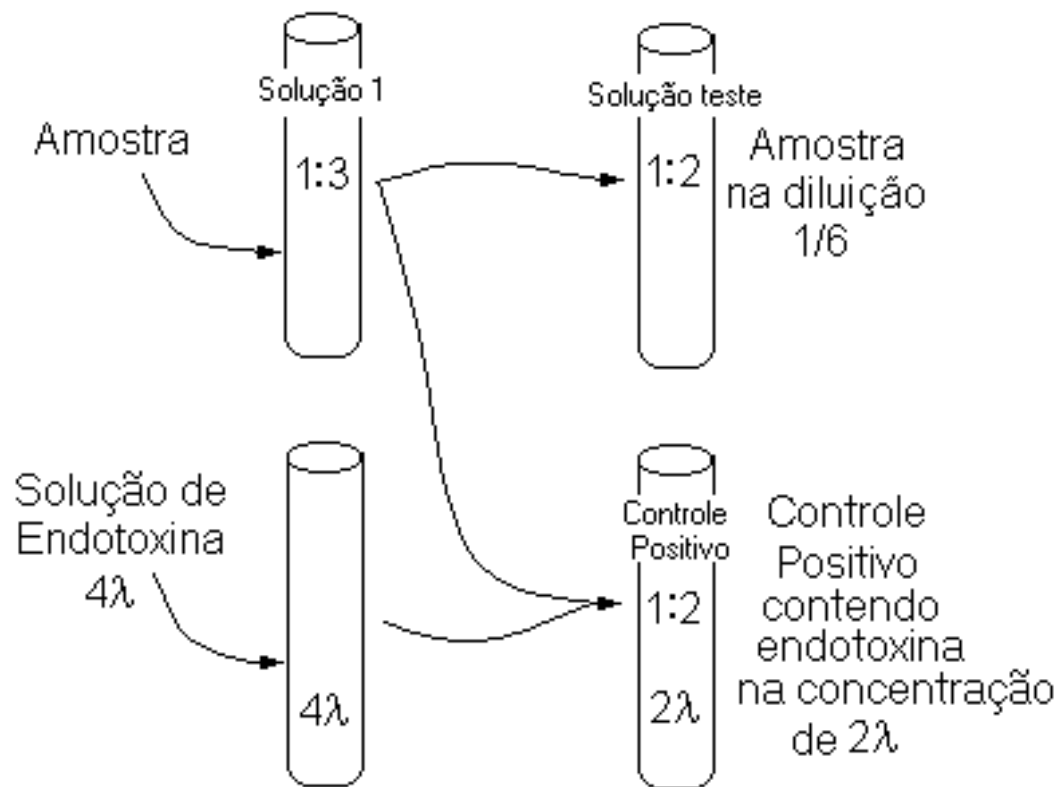
$$\text{MDV} = \frac{\text{Limite X Concentração}}{\text{Sensibilidade}}$$

MÁXIMA DILUIÇÃO VÁLIDA

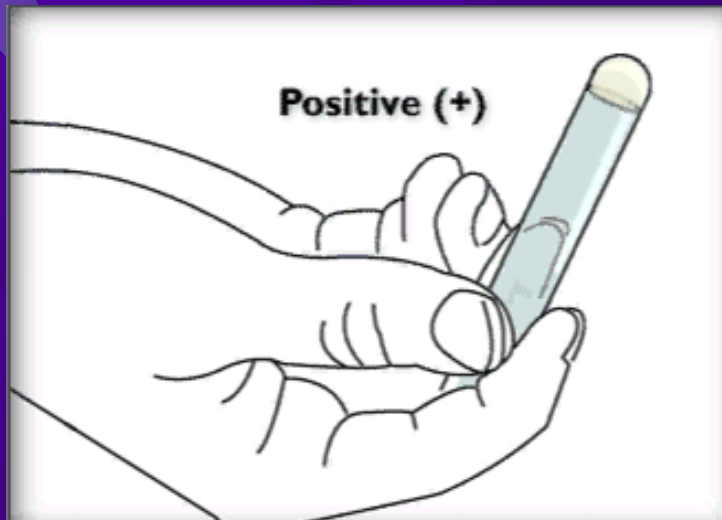
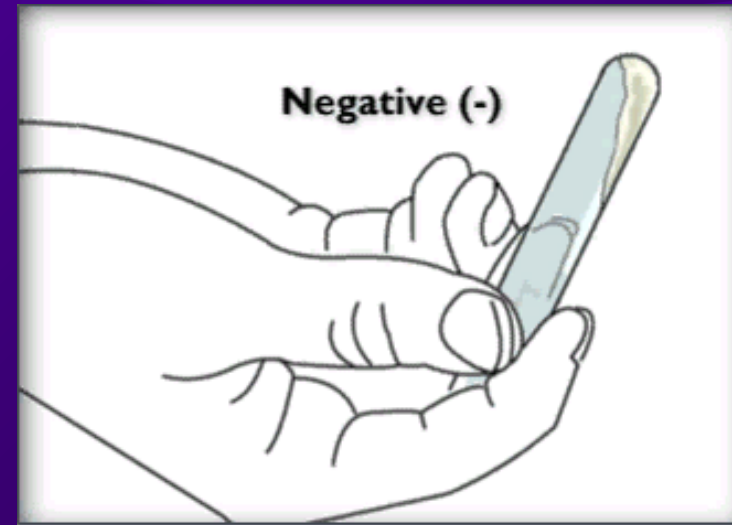
- ☀ Limite = 0,5 EU/mg
- ☀ Concentração = 2,0 mg/mL
- ☀ Sensibilidade = 0,125 EU/mL

$$\text{MDV} = \frac{0,5 \text{ EU/mg} \times 2,0 \text{ mg/mL}}{0,125 \text{ EU/mL}} = 8X$$

DILUIÇÃO DA AMOSTRA



MÉTODO DE GELIFICAÇÃO



REALIZAÇÃO DO TESTE

Solução de teste	Réplicas
A: Água (Controle negativo)	2
B: Água + Endotoxina 2λ (Controle positivo)	2
C: Água + Amostra	2
D: Água + Amostra + Endotoxina 2λ	2

INTERPRETAÇÃO

☀️ Negativo Válido

- A: (-) (-)
- B: (+) (+)
- C: (-) (-)
- D: (+) (+)

☀️ Positivo Válido

- A: (-) (-)
- B: (+) (+)
- C: (+) (+)
- D: (+) (+)

Resultado Inválido

- Falha dos controles negativo ou positivos

Reteste

- Respeitando a MDV

FATORES DE INFLUÊNCIA

- ☀ pH

- ☀ entre 6,0 e 8,0 (reagentes tamponados)

- ☀ Temperatura

- ☀ 37 ± 1 °C

- ☀ Tempo

- ☀ 60 ± 2 minutos

- ☀ Substâncias interferentes

- ☀ Cálcio / Magnésio / β -glucanos

VALIDAÇÃO DE TESTE

- ☀ Confirmação da sensibilidade do LAL
- ☀ Qualificação do analista
- ☀ Confirmação da Não-Interferência do Produto

SENSIBILIDADE DO LAL

- ☀ Preparar soluções de endotoxina com concentrações: 4λ , 2λ , λ , $\frac{1}{2}\lambda$ e $\frac{1}{4}\lambda$
- ☀ Determinar os pontos finais (PF)
- ☀ Calcular a média geométrica
- ☀ Média geométrica entre $\frac{1}{2}\lambda$ e 2λ

SENSIBILIDADE DO LAL

4λ	2λ	λ	$\frac{1}{2}\lambda$	$\frac{1}{4}\lambda$	PF
(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	$\frac{1}{2}\lambda$
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	λ
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	λ
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	λ
Média geométrica					$0,84\lambda$

QUALIFICAÇÃO ANALISTA

- ☀ Preparar soluções de endotoxina com concentrações: 4λ , 2λ , λ , $\frac{1}{2}\lambda$ e $\frac{1}{4}\lambda$
- ☀ Determinar os pontos finais (PF)
- ☀ Calcular a média geométrica
- ☀ Média geométrica entre $\frac{1}{2}\lambda$ e 2λ

QUALIFICAÇÃO ANALISTA

4λ	2λ	λ	$\frac{1}{2}\lambda$	$\frac{1}{4}\lambda$	PF
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	λ
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	λ
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	λ
(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	2λ
Média geométrica					$1,19\lambda$

INTERFERÊNCIAS

☀ Inibição

Falso negativo

- Diluição
- Ajuste de pH
- Aquecimento

☀ Exacerbação

Falso positivo

- Diluição
- Eliminar Ca^{++} / Mg^{++}
- Aquecimento

INTERFERÊNCIA PRODUTO

1ª ETAPA

- ✱ Testar a amostra em diversas diluições com controle positivo de 2λ
- ✱ Escolher menor diluição em que ocorre formação de gel para o controle positivo

1ª ETAPA

Diluição	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Amostra	(-) (-)	(-) (-)	(-) (-)	(-) (-)	(-) (-)
Amostra + Endotoxina 2 λ	(-) (-)	(-) (-)	(+) (+)	(+) (+)	(+) (+)

INTERFERÊNCIA PRODUTO

2ª ETAPA

- ☀ Testar a diluição escolhida na 1ª etapa com controle positivo de 4λ , 2λ , λ , $\frac{1}{2}\lambda$ e $\frac{1}{4}\lambda$
- ☀ Determinar pontos finais (PF) e calcular média geométrica
- ☀ Média geométrica entre $\frac{1}{2}\lambda$ e 2λ

2ª ETAPA

4λ	2λ	λ	$\frac{1}{2}\lambda$	$\frac{1}{4}\lambda$	PF
(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	$\frac{1}{2}\lambda$
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	λ
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	λ
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	λ
Média geométrica					$0,84\lambda$



MÉTODOS QUANTITATIVOS

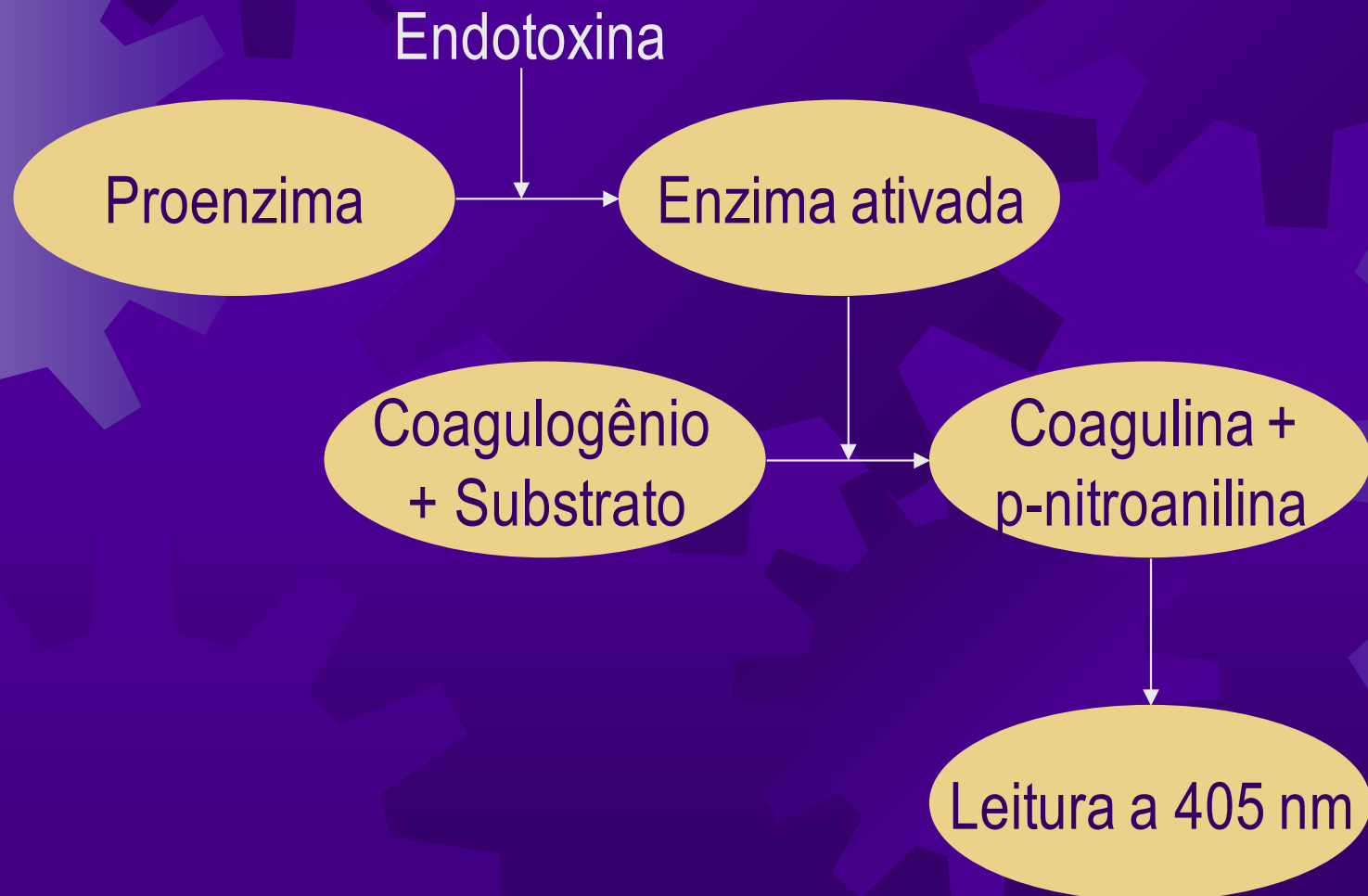
MÉTODOS QUANTITATIVOS

★ CROMOGÊNICO

- ★ Intensidade da coloração amarela inversamente proporcional ao log da concentração de endotoxina

CROMOGÊNICO

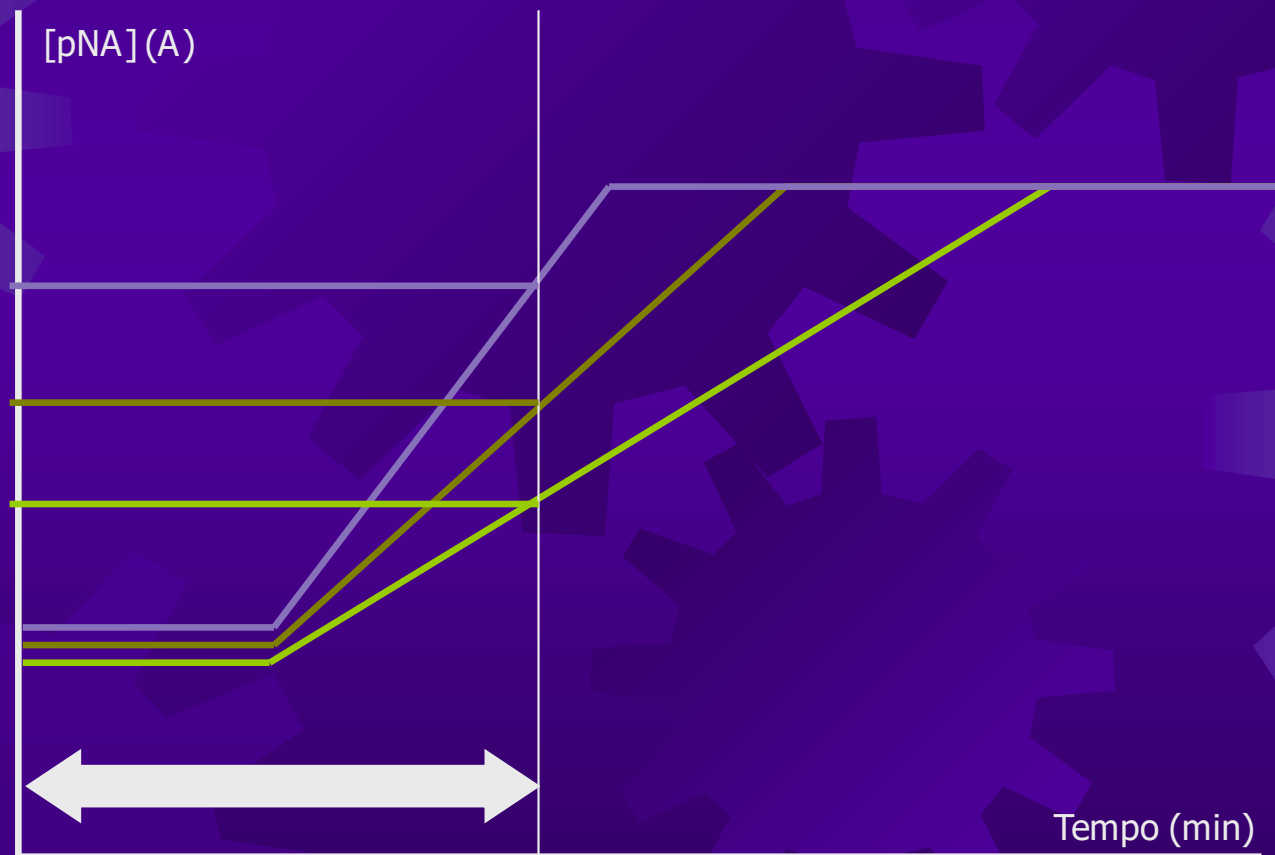
☀ Mecanismo de Reação



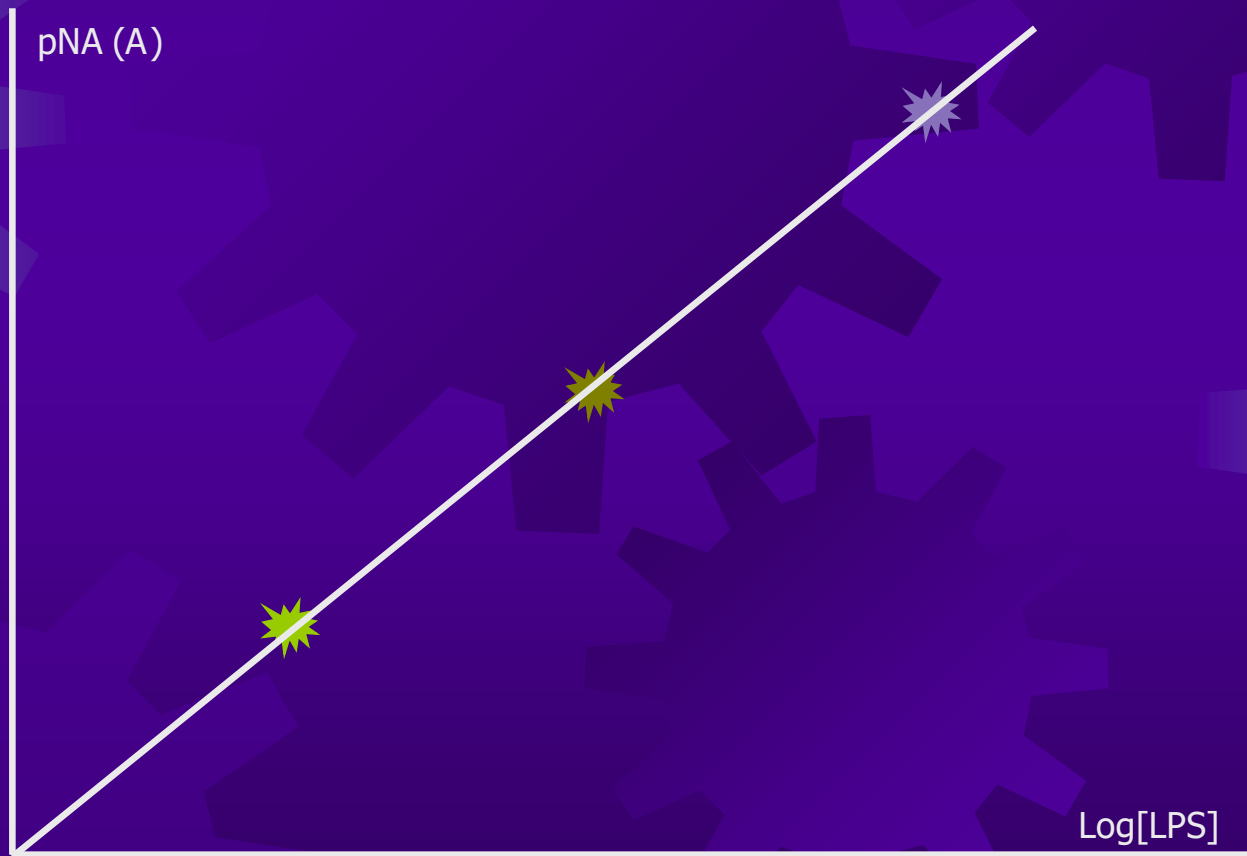
CROMOGÊNICO END-POINT

- ✱ Preparar curva padrão de endotoxina
- ✱ Preparar amostras (diluição adequada)
- ✱ Incubar por tempo pré-determinado a 37 °C (sensibilidade depende do tempo)
- ✱ Leitura em espectrofotômetro (405 nm)

CROMOGÊNICO END-POINT



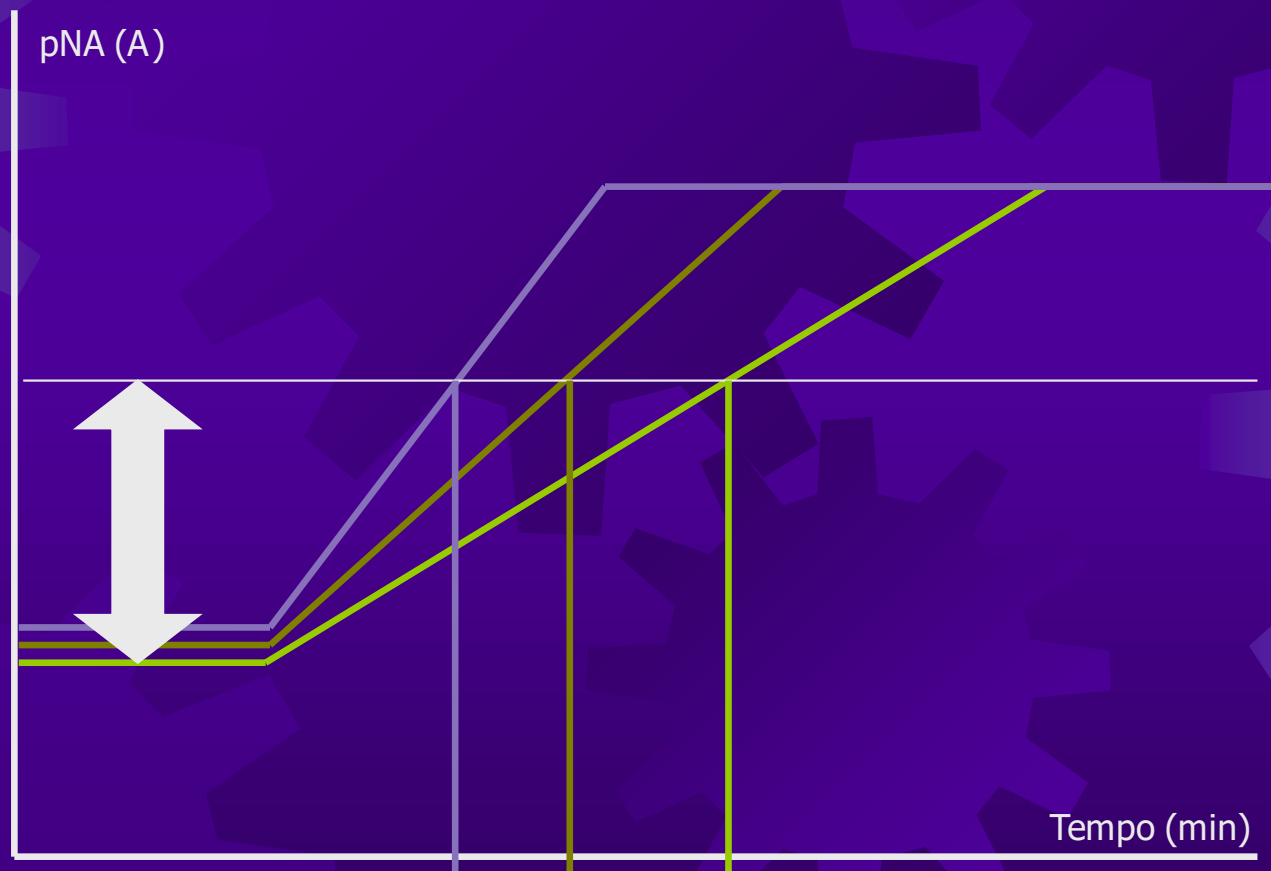
CROMOGÊNICO END-POINT



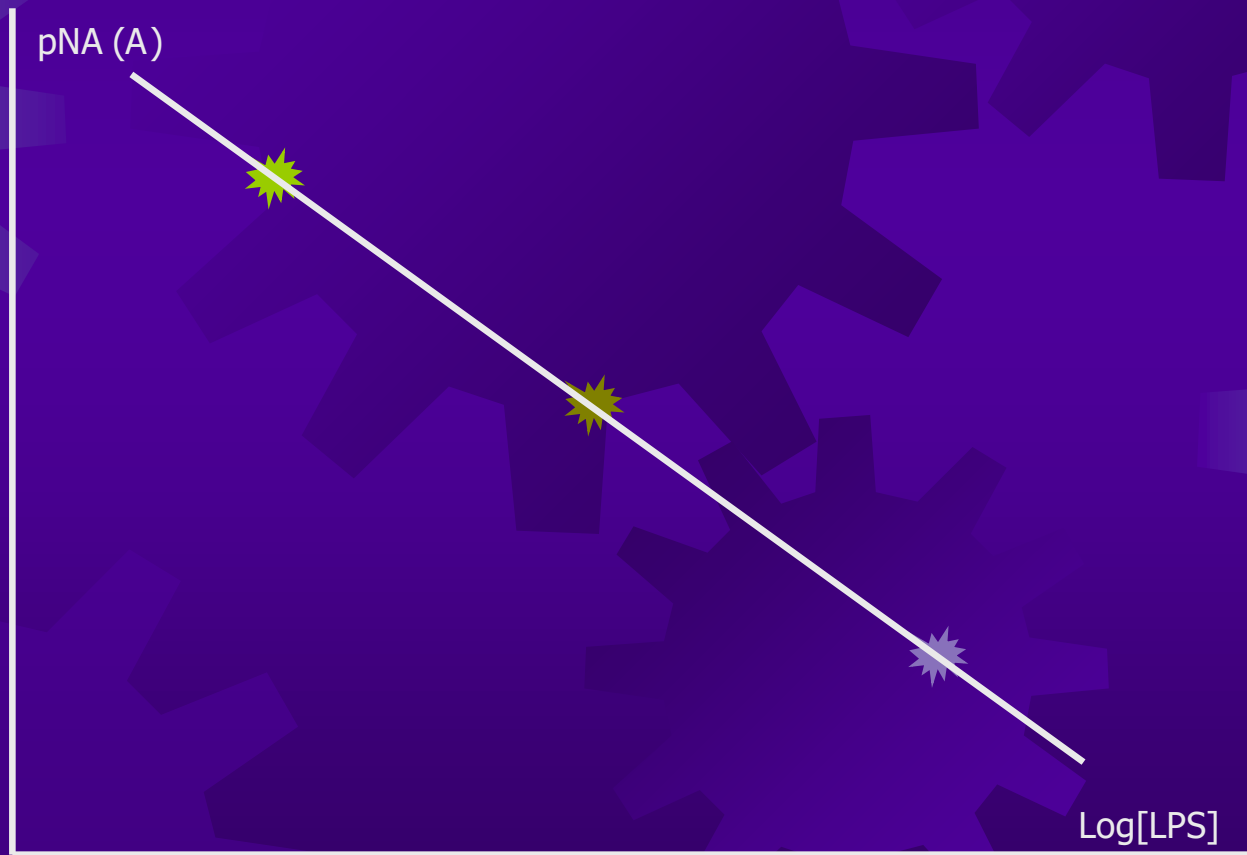
CROMOGÊNICO KINETIC

- ✱ Preparar curva padrão de endotoxina
- ✱ Preparar amostras (diluição adequada)
- ✱ Incubar em leitora/incubadora de microplaca (ELISA) a 37 °C com 40 leituras em intervalos de 150 segundos
- ✱ Determinar tempo de reação para atingir variação de 200 mOD a 405 nm

CROMOGÊNICO KINETIC



CROMOGÊNICO KINETIC



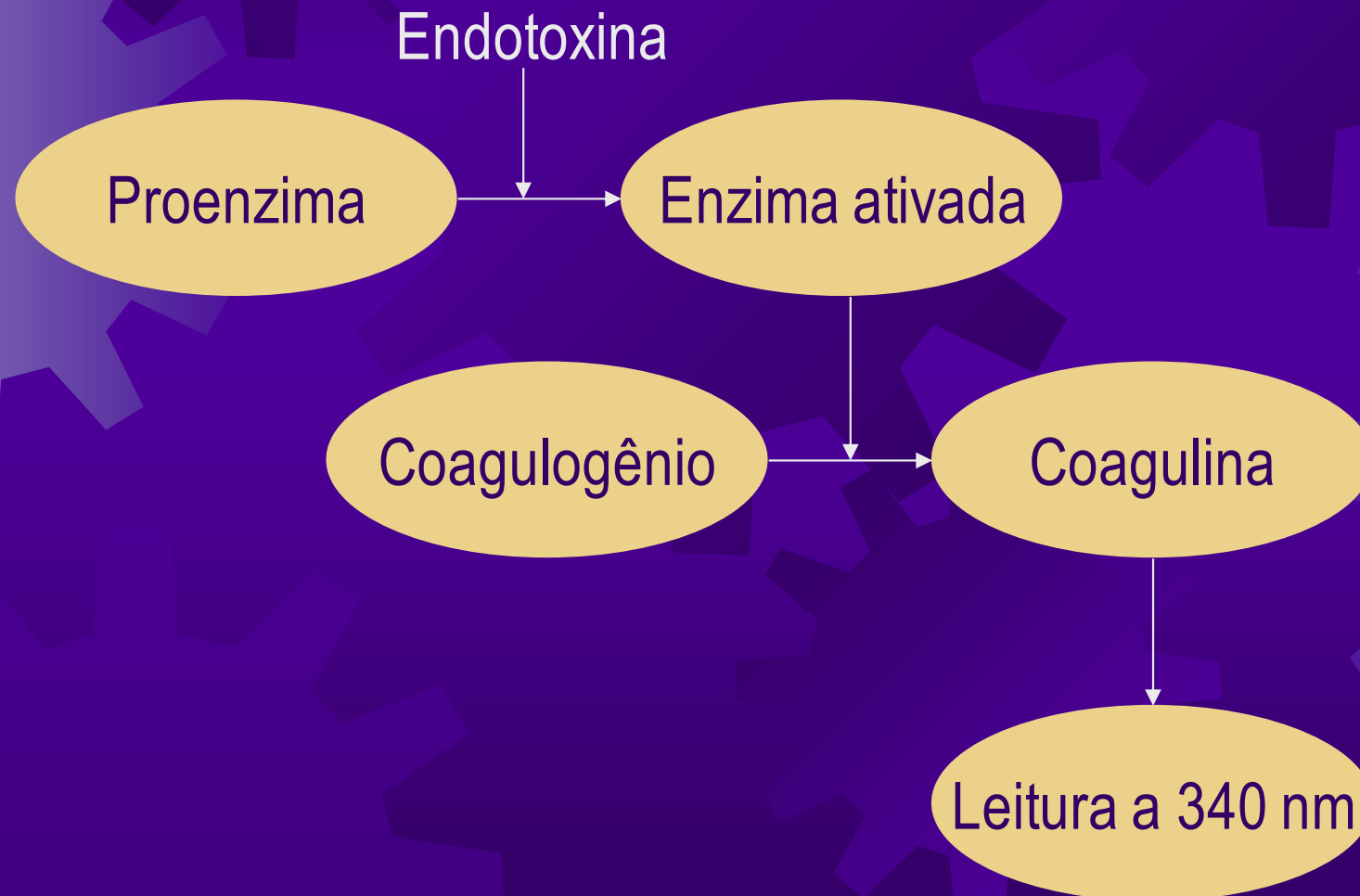
MÉTODOS QUANTITATIVOS

★ TURBIDIMÉTRICO

- ★ Intensidade da turbidez inversamente proporcional ao log da concentração de endotoxina

TURBIDIMÉTRICO

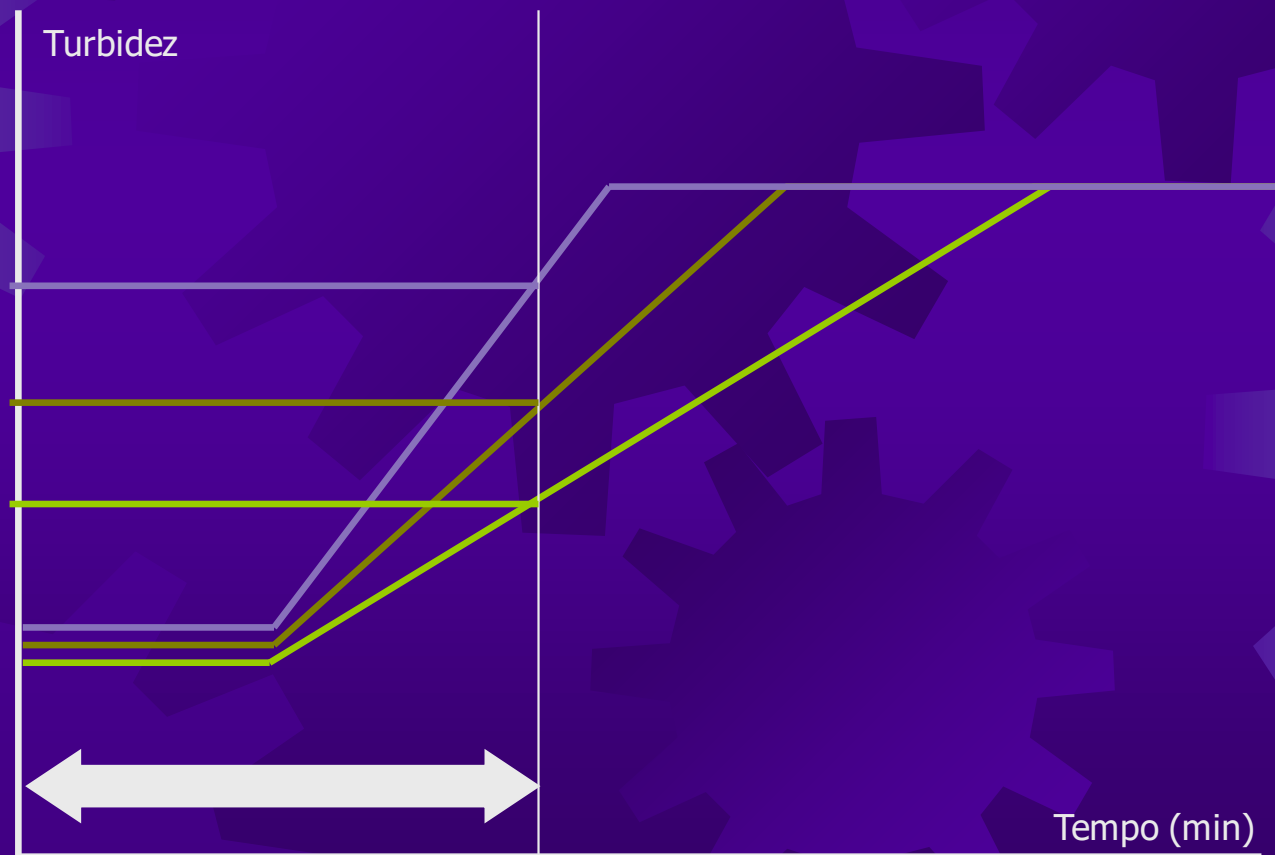
☀ Mecanismo de Reação



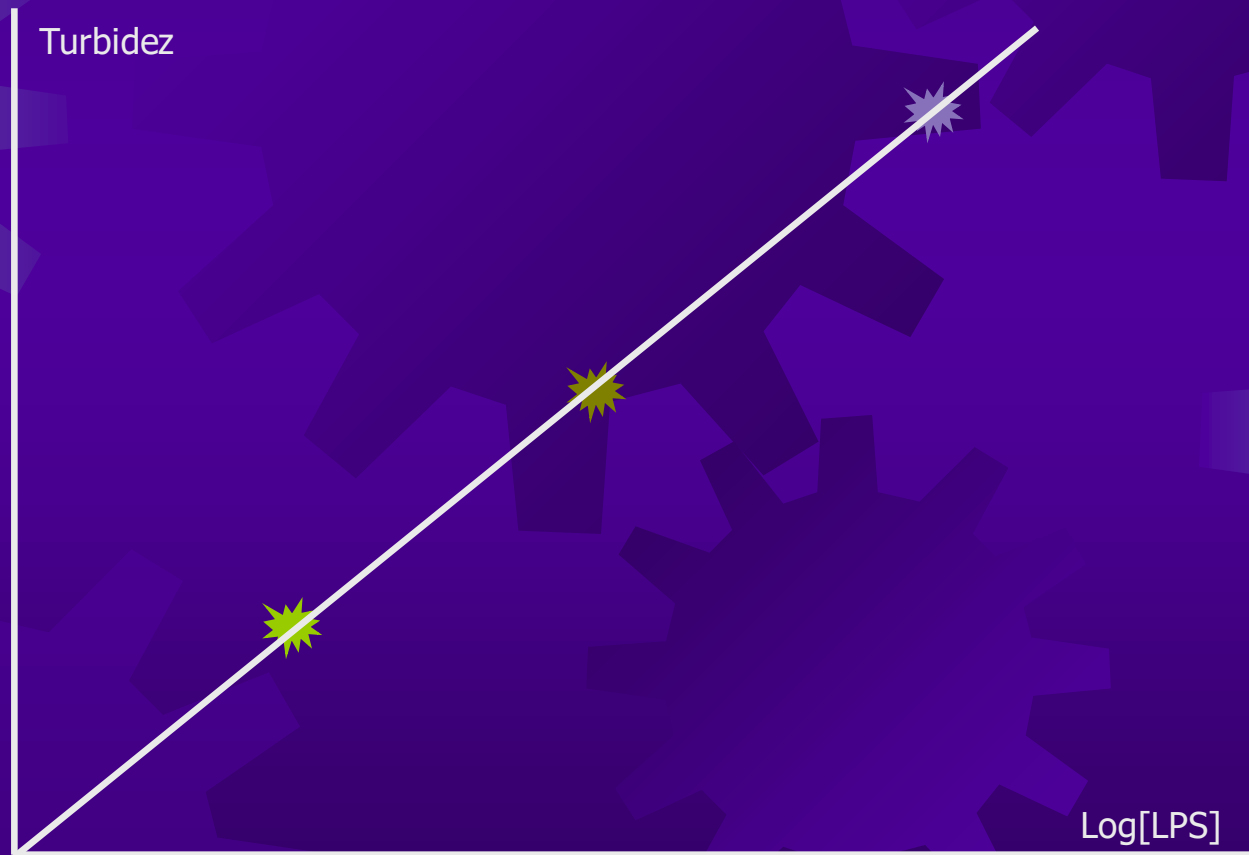
TURBIDIMÉTRICO END-POINT

- ✱ Preparar curva padrão de endotoxina
- ✱ Preparar amostras (diluição adequada)
- ✱ Incubar por tempo pré-determinado a 37 °C (sensibilidade depende do tempo)
- ✱ Leitura em espectrofotômetro (340 nm)

TURBIDIMÉTRICO END-POINT



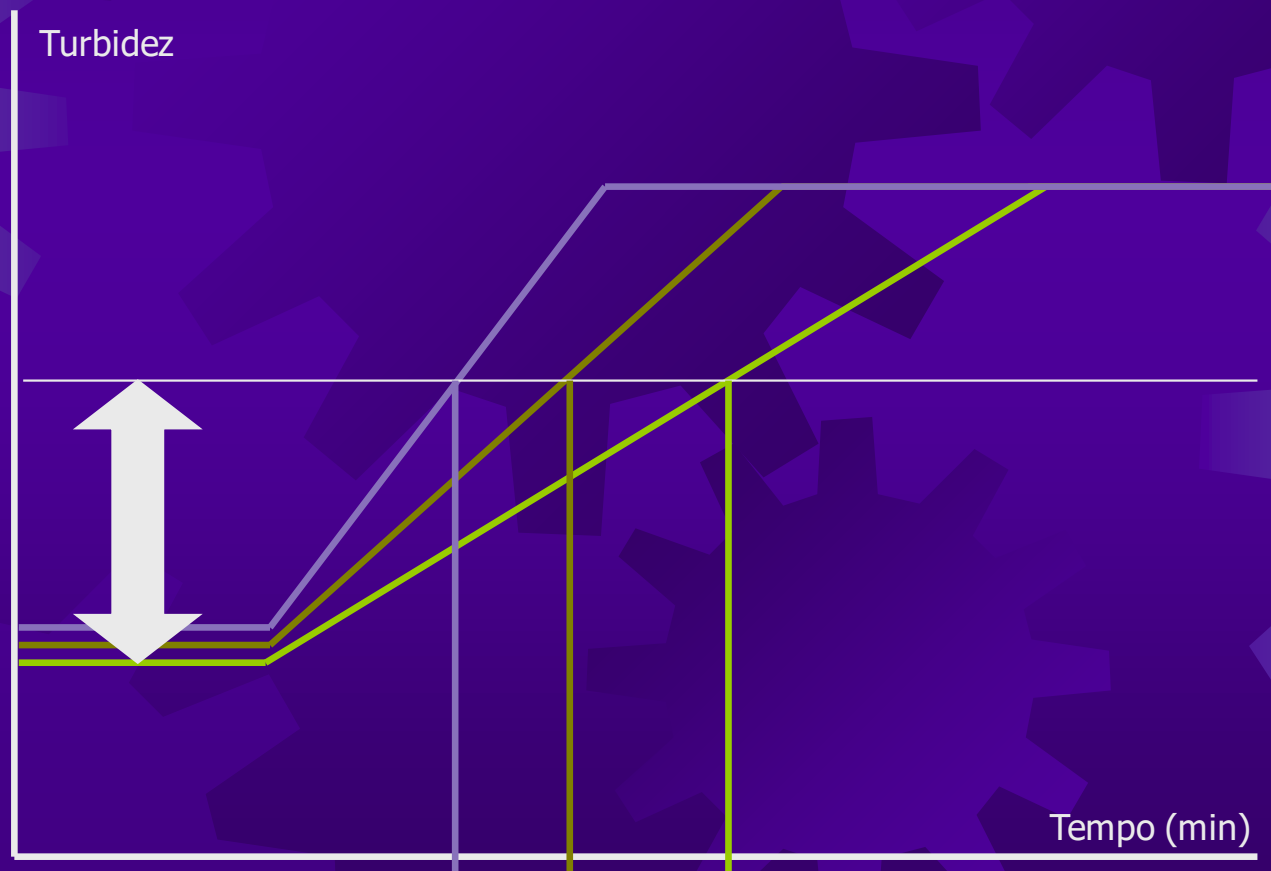
TURBIDIMÉTRICO END-POINT



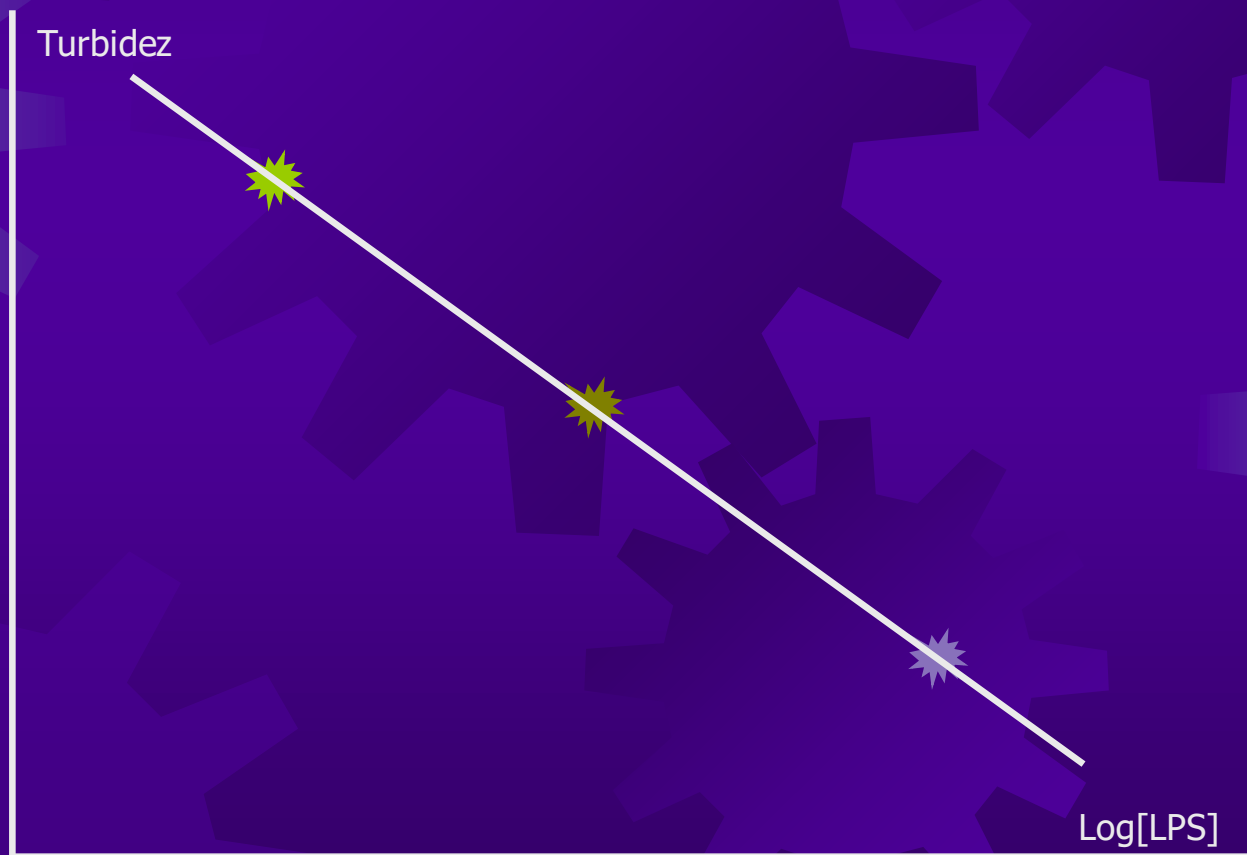
TURBIDIMÉTRICO KINETIC

- ✱ Preparar curva padrão de endotoxina
- ✱ Preparar amostras (diluição adequada)
- ✱ Incubar em leitora/incubadora de microplaca (ELISA) a 37 °C com 100 leituras em intervalos de 60 segundos
- ✱ Determinar tempo de reação para atingir variação de 30 mOD a 340 nm

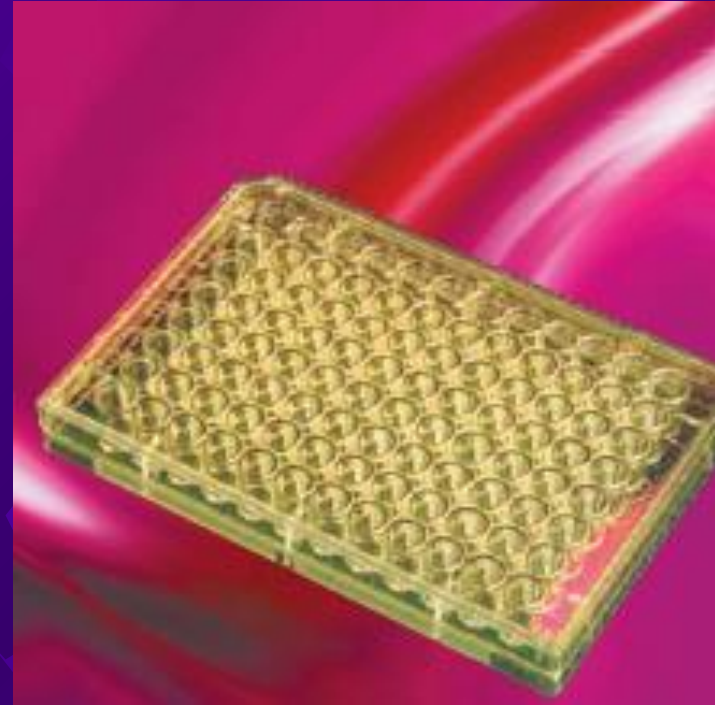
TURBIDIMÉTRICO KINETIC



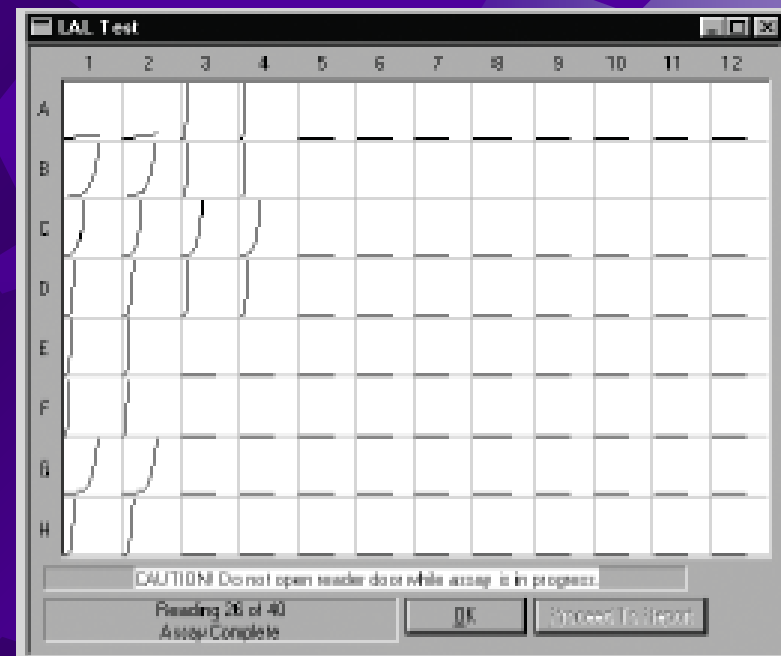
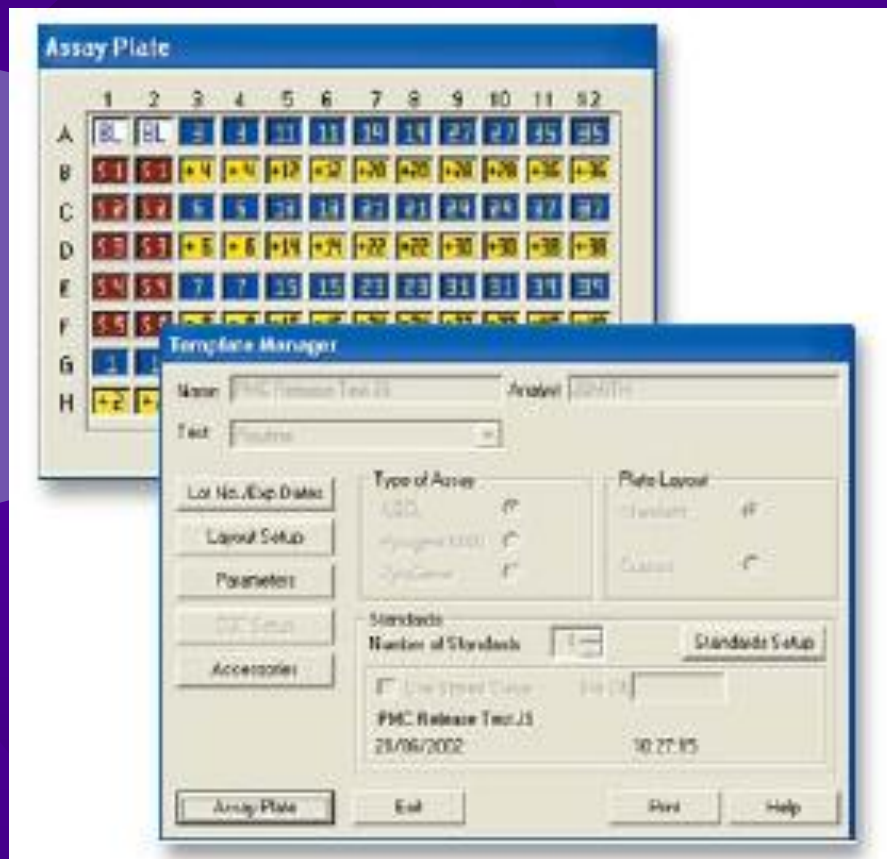
TURBIDIMÉTRICO KINETIC



EQUIPAMENTO



SOFTWARE



ENDOTOXINA BACTERIANA

MÉTODO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
GEL-CLOT	■ Facilidade de execução ■ Não necessita equipamentos ■ Baixo custo (em relação aos métodos turbidimétrico e cromogênico)	■ Ensaio semi-quantitativo ■ Baixa sensibilidade (em relação aos métodos turbidimétrico e cromogênico)
TURBIDIMÉTRICO	■ Ensaio quantitativo ■ Alta sensibilidade (em relação ao método gel-clot)	■ Interferência de amostras coloridas ■ Alto custo dos reagentes (em relação ao método gel-clot)
CROMOGÊNICO	■ Ensaio quantitativo ■ Alta sensibilidade (em relação aos métodos turbidimétrico e gel-clot)	■ Alto custo dos reagentes (em relação aos métodos turbidimétrico e gel-clot)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ★ BRITISH PHARMACOPEIA
- ★ EUROPEAN PHARMACOPEIA
- ★ FARMACOPÉIA BRASILEIRA
- ★ JAPANESE PHARMACOPEIA
- ★ PINTO, KANEKO & PINTO. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos* (2014)
- ★ UNITED STATES PHARMACOPEIA



OBRIGADO!!!

Felipe Rebello Lourenço

feliperl@usp.br