

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Produção e Controle de Medicamentos

Aplicabilidade de métodos alternativos no monitoramento da  
qualidade microbiológica da água tratada para diálise

Gabriela Corrêa Carvalho

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha de  
Jesus Andreoli Pinto

São Paulo  
2019



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Produção e Controle de Medicamentos

Aplicabilidade de métodos alternativos no monitoramento da  
qualidade microbiológica da água tratada para diálise

Gabriela Corrêa Carvalho

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 6018, de 13/10/2011.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha de  
Jesus Andreoli Pinto

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Carvalho, Gabriela Corrêa  
C331a Aplicabilidade de métodos alternativos no monitoramento da qualidade microbiológica da água tratada para diálise / Gabriela Corrêa Carvalho. -- São Paulo, 2019.  
109p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia  
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Água : Controle de qualidade. 2. Água : Análise bacteriológica. I. T. II. Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

628.161 CDD

Gabriela Corrêa Carvalho

Aplicabilidade de métodos alternativos no monitoramento da qualidade  
microbiológica da água tratada para diálise

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra.  
orientadora/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

---

3º. examinador

---

4º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.



## RESUMO

CARVALHO, G. C. **Aplicabilidade de métodos alternativos no monitoramento da qualidade microbiológica da água tratada para diálise**. 2019. 109 p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A fim de garantir a qualidade final de produtos os laboratórios de análise microbiológica fornecem dados sobre a qualidade dos mesmos em todas as suas etapas de produção. A crescente preocupação com a saúde dos pacientes conduz à busca de métodos que forneçam resultados precisos e rápidos, pois possibilitam que ações corretivas sejam tomadas em tempo real. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de tecnologia alternativa no monitoramento de endotoxina bacteriana na água tratada para diálise e dialisato e avaliar o potencial da citometria de fluxo na análise de água. Para isso utilizou-se Portable Test System (PTS<sup>®</sup>) como método alternativo para detecção de endotoxina bacteriana no monitoramento da água tratada para diálise e dialisato, o qual foi validado frente ao método convencional farmacopeico. Paralelamente realizou-se revisão narrativa da literatura a fim de avaliar a aplicabilidade da citometria de fluxo em análises de água. A análise dos diferentes parâmetros de validação para endotoxina bacteriana no método alternativo mostrou que, exceto para a menor diluição analisada, houve linearidade e precisão nos resultados. Por outro lado a concentração de 0,25 UE/mL foi a menor que apresentou exatidão e especificidade. Observou-se ainda, que o limite de detecção foi de 0,125UE/mL e o de quantificação de 0,25 UE/mL, portanto o intervalo foi de 0,25-1,0 UE/mL. Adicionalmente pela análise de resistência pode-se perceber que ao variar analistas não houve diferença significativa. Em relação ao tempo de análise em uma condição de rotina laboratorial com muitas amostras, o PTS<sup>®</sup> mostrou-se demorado. Ressalta ainda, que seria importante que a legislação vigente determinasse a análise mensal de endotoxinas no dialisato. A revisão da literatura evidencia o potencial da tecnologia de citometria de fluxo, pois a mesma mostrou-se satisfatória quando comparada a metodologias convencionais para análise de água. O trabalho desenvolvido permitiu concluir que o PTS<sup>®</sup> mostrou-se adequado para analisar amostras *in loco*, permitindo análises em tempo real, que para as quais haja a expectativa de ausência de endotoxinas ou de concentração respeitando o intervalo de 0,25 UE/mL a 1,0 UE/mL. Quanto a citometria de fluxo, esta mostrou-se uma tecnologia promissora em analisar amostras de água, sendo portanto recomendável proceder a estudos de validação e aplicabilidade.

**Palavras-chave:** Hemodiálise. Contaminação microbiológica da água. Endotoxina bacteriana. Métodos alternativos.



## ABSTRACT

CARVALHO, G. C. **Applicability of alternative methods for the monitoring microbiological quality of treated water for dialysis.** 2019. 109 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

In order to guarantee the final quality of products, the microbiological analysis laboratories provide data about their quality at all production stages. The growing concern for patients' health leads to the search for methods that provide accurate and fast results, as they enable corrective actions to be taken in real time. The present work aimed to evaluate the alternative technology potential in the monitoring of bacterial endotoxin in treated water for dialysis and dialysate and to evaluate the potential of flow cytometry in water analysis. The different validation parameters analysis for bacterial endotoxin in alternative method showed that, except for the lowest dilution analyzed, there was linearity and precision in the results. On the other hand, the concentration of 0.25 EU / mL was the lowest that presented accuracy and specificity. It was further observed that the detection limit was 0.125UE / mL and the quantification limit was 0.25 EU / mL, so the range was 0.25-1.0 EU / mL. Additionally by the ruggedness analysis it was possible to perceived that when varying analysts there was no significant difference. Regarding the analysis time in a laboratory routine condition with many samples, the PTS<sup>®</sup> was time consuming. It was also observed that it would be important to determine monthly analysis of endotoxins in dialysate. The literature review evidence the flow cytometry technology potential of the because it was satisfactory when compared to conventional methodologies for water analysis. The research showed that the PTS<sup>®</sup> was suitable for analyzing samples in loco, allowing real-time analyzes, for which there is expectation of endotoxins absence or concentration respecting the range of 0.25 EU / mL to 1.0 EU / mL. For the flow cytometry, it was shown to be a promising technology for analyzing water samples, and it is therefore advisable to carry out validation and applicability studies.

**Keywords:** Hemodialysis. Water microbiological contamination. Bacterial endotoxin. Alternative methods.



## DEDICATÓRIA

À minha mãe, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Aos meus avós, Regina e Antônio Nelson (*in memoriam*), que foram exemplos de caráter e dignidade.



## AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível devido a colaboração e apoio de inúmeras pessoas que tive o prazer de compartilhar esta jornada.

Primeiramente quero agradecer a minha orientadora, **Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto**, pelos ensinamentos, apoio e estímulos que tornaram possíveis a realização desta obra, assim sua contribuição inestimável para o meu desenvolvimento científico.

À **Dra Adriana Bugno, Adriana Aparecida Buzzo Almodovar e Fernando Pontes de Lima** pela atenção, disponibilidade e ensinamentos.

À **Profa. Dra. Kazuko Uchikawa Graziano** pelo incentivo, conselhos e colaborações em minha formação acadêmica.

À todos os funcionários da Unidade de diálise do Hospital das Clínicas da FMB-UNESP, em especial a **Dra. Edwa Bucovic** e eng. **Vinicius Tadeu Ramires**, por toda colaboração.

À todos os funcionários do Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins e Respectivas Matérias-Primas (CONFAR), com os quais tive a imensa alegria de conviver durante este período.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, em especial ao **Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço, Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi, Profa. Dra. Telma Mary Kaneko**, com os quais tive a sorte de conhecer durante minha formação.

Agradeço a todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, em especial à **Ellen Gameiro Hilinski, Gustavo Muneo Takata e Edilson Marcelo Nazareth Junior** pela amizade e convivência.



## **AGRADECIMENTO INSTITUCIONAL**

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da **Universidade de São Paulo** e ao **Programa de Pós-Graduação de Fármaco e Medicamentos, Área de Produção e Controle de Medicamentos**, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao **CONFAR** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP por todo apoio durante a realização do projeto.

Ao **Laboratório de Controle Biológico de Medicamentos e Cosméticos** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP por todo apoio durante a realização do projeto.

Ao Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes do **Instituto Adolfo Lutz IAL**, em São Paulo por colocar o laboratório e equipamentos à disposição, além da doação dos materiais de consumo.

Ao Centro de Diálise do Hospital das Clínicas da **Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP** pelo fornecimento das amostras.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela concessão da bolsa de mestrado.



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1.1- Prevalência estimada de pacientes em diálise no Brasil, por região, 2013-2016...32
- Figura 1.2- Incidência estimada de pacientes em diálise no Brasil, por região, 2013-2016.....33
- Figura 1.3- Esquema de tratamento de água para diálise.....34
- Figura 1.4- Frequência de parâmetros insatisfatórios obtidos nos programas de monitoramento da água tratada para hemodiálise, no Estado de São Paulo.....43

### Capítulo 2

- Figura 2.1- Representação das diluições da endotoxina padrão de *Escherichia coli* em cinco concentrações.....57
- Figura 2.2- Representação esquemática do teste de coagulação em gel.....58
- Figura 2.3- Representação linear dos resultados de validação.....62
- Figura 2.4- Comparação das médias dos dois analistas dos resultados obtidos pelo PTS<sup>®</sup> .....65

### Capítulo 3

- Figura 3.1- Esquema do funcionamento de um citômetro de fluxo.....83
- Figura 3.2- Esquema de diferentes locais-alvo celulares de fluorocromos.....85



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

Tabela 2.1- Distribuição dos resultados do método convencional em relação ao alternativo.	62
Tabela 2.2- Resultados obtidos da validação do método alternativo após correção com a equação da reta obtida por regressão linear.	63
Tabela 2.3- Coeficiente de variação dos dados de validação corrigidos pela equação da reta.	63
Tabela 2.4- Distribuição dos dados das análises do método convencional e alternativo por dia e analistas.	65
Tabela 2.5- Comparação das médias do nível de endotoxina pelo método convencional e alternativo das amostras de água tratada para diálise e dialisato.	66
Tabela 2.6- Comparação das médias positivas e negativas de cada método.	69
Tabela 2.7- Critérios de aceitação segundo o fabricante e os respectivos valores da validação e aplicabilidade.	70
Tabela 2.8- Comparativo de tempo médio gasto para determinação de endotoxina em 8 amostras em triplicata.	72



## LISTA DE QUADROS

### Capítulo 1

Quadro 1.1- Padrão de qualidade biológica e microbiológica da água para diálise.....39

### Capítulo 2

Quadro 2.1- Critérios de validação indicados considerando tipo de análise pela Farmacopeia Americana, *Technical Report* n. 33 e Farmacopeia Brasileira.....56

Quadro 2.2- Descrição dos parâmetros, formas de análise e critérios de aceitação para validação de métodos microbiológicos e biológicos alternativos.....59

### Capítulo 3

Quadro 3.1- Descrição de artigos que aplicaram a citometria de fluxo na análise de água desde 1992.....87





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

agar R2A	<i>Reasoner's 2A agar</i>
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
BCECF-AM	2', 7'-bis-(2-carboxietil)-5-(e-6)- éster acetoximetil carboxifluoresceína
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
CNA	Controle Negativo da Água Grau Reagente LAL
CPA	Controle Positivo da Água Grau Reagente LAL
CPP	Controle Positivo do Produto
CSE	Endotoxina Padrão de <i>Escherichia coli</i>
CTC	Cloreto de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazólio
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DiBAC4(3)	Ácido (bis-1,3-dibutilbarbitúrico) trimetina oxonol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DVC	Contagem Direta de Viáveis
EPS	Exopolissacarídeos
FALS	<i>Forward Angle Light Scatter</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FS	<i>Forward Scatter</i>
h	Horas
HNA	Alto Teor de Ácido Nucleico
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
IRC	Insuficiência Renal Crônica
ISO	Organização Internacional de Normalização
Km	Quilômetro
L	Litro
LAL	Lisado de Amebócitos do Limulus
LPS	Lipopolissacarídeo
MDV	Máxima Diluição Válida

min	Minutos
mL	Mililitro
n	Número
NADS	<i>Nucleic acid double-staining</i>
nm	Nanômetro
NMP	Número Mais Provável
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PDA	<i>Parental Drug Association</i>
PEX	Polietileno Reticulado
PI	Iodeto de propídio
pm	Picômetro
pmp	Por Milhão da População
PTS <sup>®</sup>	<i>Portable Test System</i> <sup>®</sup>
PVC	Cloreto de Polivinila
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
R <sup>2</sup>	Coeficiente de Correlação
RALS	<i>Right Angle Light Scatter</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SS	<i>Side Scatter</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TOC	Carbono Orgânico Total
TRS	Terapia Renal Substitutiva
TSS	Sólidos Suspensos Totais
UE	Unidade de Endotoxina
UFC	Unidade Formadoras de Colônias
VNC	Viáveis-não-cultiváveis
VSS	Sólidos Suspensos Voláteis
$\lambda$	Lambda
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>2 CAPÍTULO I - REFLEXÃO SOBRE OS AVANÇOS TECNOLÓGICOS NO CONTROLE DA QUALIDADE DA ÁGUA TRATADA PARA HEMODIÁLISE.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 A DOENÇA RENAL CRÔNICA E O TRATAMENTO DIALÍTICO.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2 ÁGUA TRATADA PARA HEMODIÁLISE.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3 CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA E BIOLÓGICA DA ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4 LEGISLAÇÃO VIGENTE SOBRE ÁGUA DE DIÁLISE.....</b>	<b>38</b>
<b>2.5 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CONVENCIONAIS E ALTERNATIVOS.....</b>	<b>40</b>
2.5.1 Enumeração de bactérias heterotróficas.....	40
2.5.2 Endotoxinas bacterianas.....	41
<b>2.6 MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE.....</b>	<b>42</b>
<b>2.7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>2.8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>
<b>3 CAPÍTULO II - VALIDAÇÃO E APLICABILIDADE DE UM MÉTODO ALTERNATIVO NO MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>56</b>
3.2.1 Validação.....	56
3.2.2 Aplicabilidade do método alternativo.....	60
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
3.3.1 Validação.....	61
3.3.2 Aplicabilidade do método alternativo.....	66
<b>3.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>3.5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

<b>4 CAPÍTULO III - CITOMETRIA DE FLUXO: APLICAÇÕES NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA.....</b>	<b>79</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>4.2 BREVE HISTÓRICO.....</b>	<b>81</b>
<b>4.3 PRINCÍPIOS DA CITOMETRIA DE FLUXO.....</b>	<b>83</b>
<b>4.4 APLICABILIDADE DA CITOMETRIA DE FLUXO NA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA .....</b>	<b>85</b>
<b>4.5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>4.6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>109</b>

# *1 INTRODUÇÃO*



A água, recurso natural amplamente utilizado, é a matéria prima de maior volume empregada em formulações farmacêuticas líquidas. Dentre os tipos de água pode-se destacar a água tratada para diálise, a qual vem sendo extensamente utilizada no tratamento de pacientes com problemas renais crônicos e, com o aumento na incidência e prevalência, torna-se uma questão de saúde pública mundial. Esse tratamento, que modificou o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), pode ocasionar sérias complicações aos pacientes se utilizada água fora dos padrões de qualidade.

Vários casos de surtos em decorrência da falta de qualidade da água tratada para diálise impulsionaram a publicação de resoluções que garantissem a sua qualidade microbiológica e físico-química. Alguns estados, como o de São Paulo, implantaram programas de monitoramento, os quais têm se mostrado muito eficientes.

Apesar dos métodos microbiológicos convencionais serem eficientes, de fácil execução e confiáveis em virtude do longo histórico de utilização, possuem limitações como o tempo gasto para obtenção de resultados, a variabilidade dos microrganismos, a seletividade do meio de cultura e a variabilidade da técnica do analista.

Muitas vezes, a contagem obtida por metodologia convencional não representa a microbiota real da amostra, pois, o ambiente aquático possui bactérias incapazes de crescer em meio de cultura, além de bactérias aderidas em superfícies que não são coletadas. Ambas as situações causam risco ao paciente exposto ao tratamento dialítico. Em razão dos riscos provenientes dos agentes microbiológicos aos quais os pacientes estão expostos, é de grande importância a adoção de métodos alternativos previamente validados.

Entre as vantagens dos métodos microbiológicos alternativos, pode-se destacar a obtenção dos resultados em tempo menor, o que possibilita resultados em tempo real permitindo que ações corretivas sejam tomadas. Associando-se os avanços da ciência e tecnologia à maior expectativa de vida da população, trabalhos que abordem situações de risco aos pacientes e métodos que permitam resultados ágeis e que obedeçam aos parâmetros de qualidade devem ser desenvolvidos e, na medida do possível, implementados.

Neste contexto o presente trabalho teve por objetivo monitorar a qualidade biológica da água tratada para diálise e dialisato e proceder a estudos de validação de testes alternativos e sua aplicabilidade e avaliar o potencial da citometria de fluxo na análise de água.



# *2 Capítulo I\**

**REFLEXÃO SOBRE OS AVANÇOS TECNOLÓGICOS NO CONTROLE DA  
QUALIDADE DA ÁGUA TRATADA PARA HEMODIÁLISE**

---

\* A informação contida neste capítulo foi aceita para publicação no periódico Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (conceito Qualis 2016:B2 Farmácia).



## 2.1 A DOENÇA RENAL CRÔNICA E O TRATAMENTO DIALÍTICO

Os rins são órgãos localizados na parede posterior do abdômen, posicionados em cada um dos lados da coluna vertebral, contudo, em virtude da localização do fígado, o rim direito apresenta-se menor e localiza-se um pouco abaixo do rim esquerdo. Cada rim é composto de aproximadamente 800.000 a 1 milhão de néfrons, sua unidade funcional (GUYTON; HALL, 2011; KOEPPEN; STANTON, 2009).

Os rins exercem grande importância no organismo, pois eliminam produtos indesejáveis do metabolismo, substâncias químicas estranhas e toxinas. Exercem manutenção da homeostase mediante a regulação do balanço de água e eletrólitos, regulação da pressão arterial por meio da excreção de hormônios ou substâncias vasoativas como a renina, regulam o balanço acidobásico por intermédio da excreção de ácidos e promovem a regulação dos tampões corporais, estimulam a produção de eritrócitos pela excreção da eritropoetina na circulação, auxiliam na formação dos ossos pela produção de vitamina D e realizam a síntese da glicose durante o jejum prolongado ou seja realizam a gliconeogênese (GUYTON; HALL, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2018).

A perda progressiva e irreversível destas funções acrescida de lesão renal resulta em doença renal crônica. Essa doença possui vários estágios sendo o último a insuficiência renal crônica, no qual os rins não são mais capazes de manter a normalidade, sendo recomendado o tratamento dialítico ou transplante renal (ROMÃO, 2004).

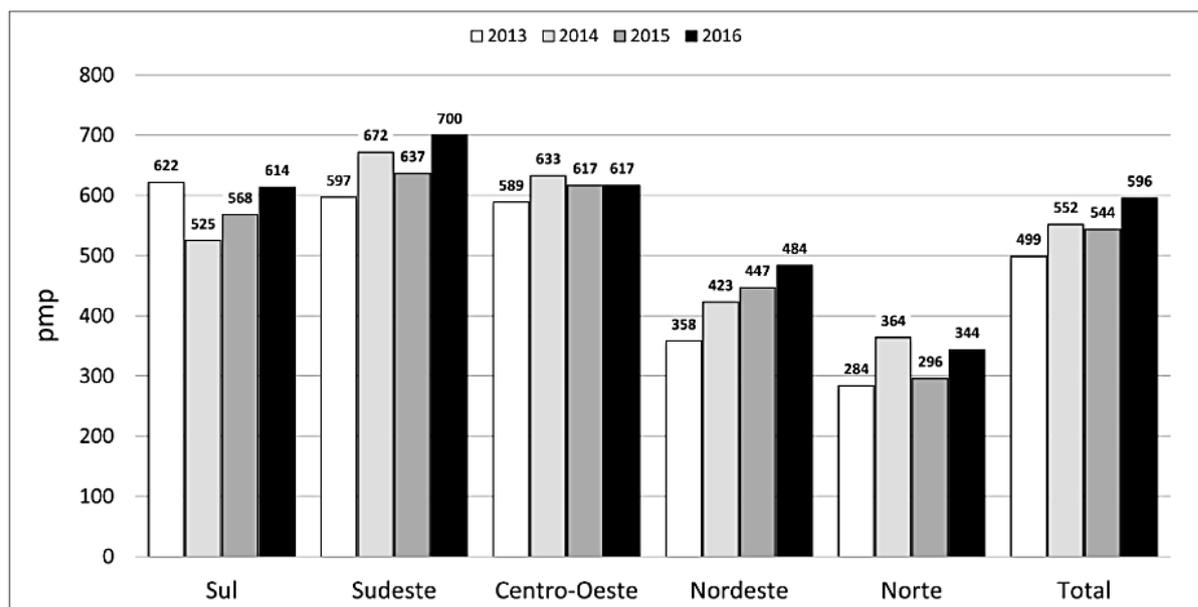
Neste contexto, a diálise vem sendo extensamente utilizada, tendo modificado o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes. O químico escocês Granham, em 1854, utilizou o termo “diálise” pela primeira vez ao observar a separação de substâncias coloides e cristaloides utilizando membrana semipermeável constituída de material vegetal (RIELLA, 2010).

Na Holanda, em meados de 1944, Kolff criou o rim artificial sendo realizada a primeira diálise com sucesso, a paciente submetida a essa terapia sobreviveu por mais de seis anos. Somente em 1949 foi realizada a primeira hemodiálise no Brasil, no Hospital das Clínicas, em São Paulo, iniciando o desenvolvimento dessa técnica, porém apenas na década de 1960 foi introduzida a hemodiálise como uma terapêutica para pacientes com insuficiência renal crônica (SOCIEDADE DE NEFROLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2009).

No Brasil existem 834 unidades de diálise cadastradas na Sociedade Brasileira de

Nefrologia, destas 747 possuem programa ativo para tratamento dialítico crônico, dados do último inquérito de diálise crônica realizado em 2016. Houve aumento do número de centros de tratamento dialítico crônico que no inquérito anterior, em 2015, registrou 726. Estima-se que, hoje, 122.825 pacientes são submetidos a esse tratamento. O Brasil possui uma prevalência de tratamento dialítico de 596 pacientes por milhão da população (pmp), e a região sudeste é a mais prevalente (Figura 1.1). Na análise por estado, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia são os que possuem o maior número de pacientes. Houve 39.714 novos pacientes, ou seja, uma taxa de incidência de 193 pmp, sendo a região centro-oeste a mais incidente (Figura 1.2), porém o estado de São Paulo é o que possui maior número de novos pacientes, 48% (SESSO *et al.*, 2017).

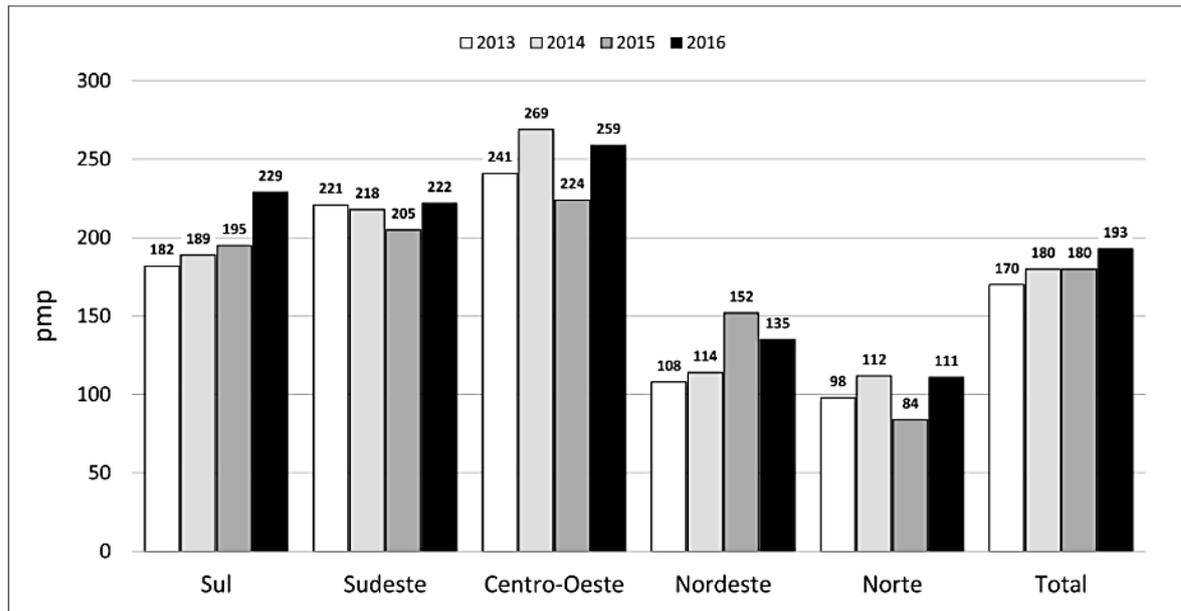
Figura 1.1- Prevalência estimada de pacientes em diálise no Brasil, por região, 2013-2016



Legenda: PMP - por milhão da população

Fonte: SESSO *et al.*, 2017.

Figura 1.2- Incidência estimada de pacientes em diálise no Brasil, por região, 2013-2016



Legenda: PMP - por milhão da população

Fonte: SESSO *et al.*, 2017.

O tratamento dialítico consiste na remoção do excesso de água e solutos por meio de uma membrana semipermeável. Existem dois tipos de tratamentos dialíticos, a diálise peritoneal e a hemodiálise (DAUGIRDAS; BLAKE; ING, 2016). No inquérito de diálise crônica realizado em 2016, dos pacientes em tratamento dialítico, 92% estavam submetidos a hemodiálise e 8% em diálise peritoneal (SESSO *et al.*, 2017).

Na diálise peritoneal, o peritônio age como uma membrana que irá separar a solução de diálise (dialisato) dos capilares peritoneais, as trocas de água e solutos ocorrem por difusão, ultrafiltração e absorção simultaneamente, ao drenar a solução serão eliminados do organismo as toxinas e o excesso de água. A solução de diálise é industrialmente acondicionada em bolsas plásticas transparentes e flexíveis, disponíveis nos volumes de 1,5, a 3 litros (DAUGIRDAS; BLAKE; ING, 2016; RIELLA, 2010).

Na hemodiálise, os pacientes são expostos semanalmente a 360 litros de água, volume consideravelmente grande quando comparado ao consumo habitual de uma pessoa, 10 litros por semana. Convencionalmente ou de acordo com a avaliação clínica de cada paciente, o tratamento semanal pode consistir de três sessões de hemodiálise de aproximadamente 4 horas de duração, perfazendo um total de 12 horas semanais (RIELLA, 2010).

A máquina de hemodiálise realiza a mistura do concentrado de eletrólitos com a água tratada, resultando na solução de diálise, a qual é enviada ao dialisador onde o sangue entra

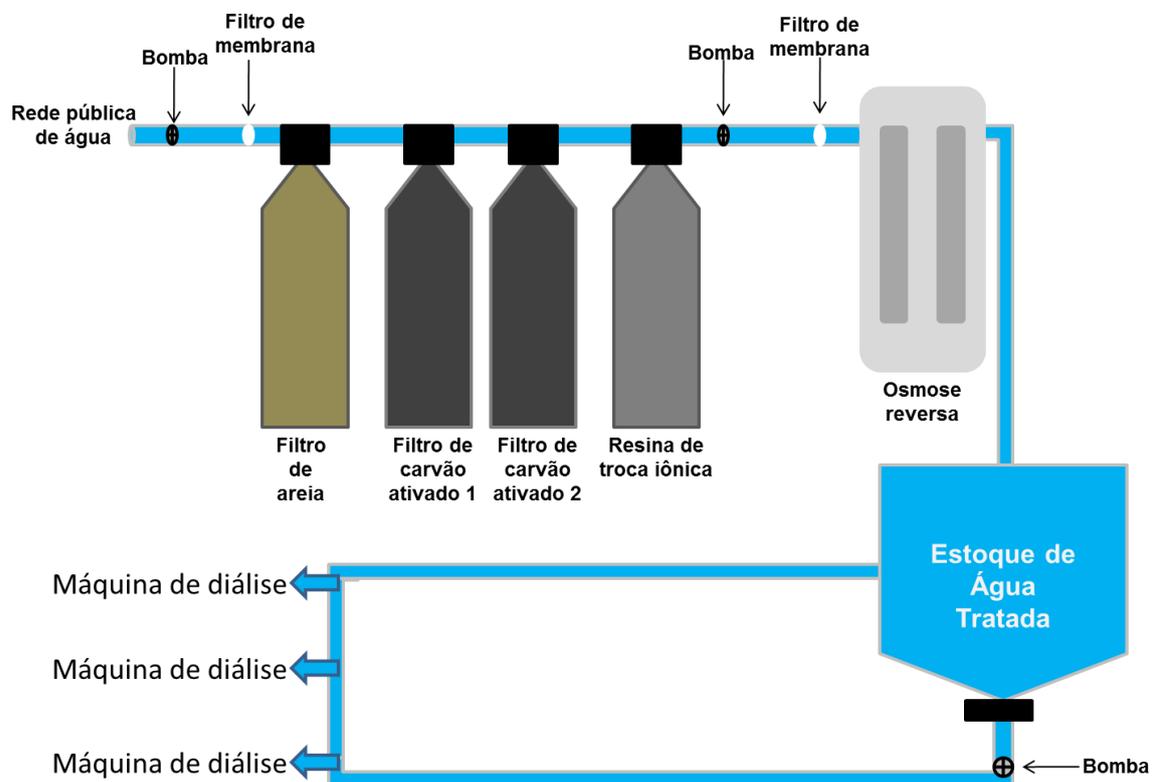
em contato com a solução de diálise por meio de membranas semipermeáveis, proporcionando as trocas de substâncias entre o sangue e a solução de diálise. A cada sessão aproximadamente 120 a 200 litros de água purificada entrarão em contato com o sangue do paciente (DAUGIRDAS; BLAKE; ING, 2016).

## 2.2 ÁGUA TRATADA PARA HEMODIÁLISE

Contaminantes de baixo peso molecular presentes na solução de diálise podem atravessar a membrana destinada à filtração atingindo a corrente sanguínea e ocasionando graves complicações ao paciente, por esse motivo é de extrema importância que esta solução tenha pureza química e microbiológica (PONTORIERO *et al.*, 2003; RAMIREZ, 2009).

O concentrado de diálise em pó ou solução, por se tratar de um produto industrializado, é submetido a um rigoroso controle de qualidade e a vigilância dos órgãos reguladores, ao passo que a qualidade da água utilizada para hemodiálise é de responsabilidade da unidade de diálise (DAUGIRDAS; BLAKE; ING, 2016). A Figura 1.3 ilustra um modelo esquematizado de um sistema de tratamento de água para diálise.

Figura 1.3- Esquema de tratamento de água para diálise



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Primeiramente, a água passa por um filtro de membrana e por um de filtro de sedimentação de areia, ambos com a finalidade de eliminar partículas. Em seguida, a água passa por dois filtros de carvão ativado, no qual o cloro e a cloramina são retidos e contaminantes orgânicos são reduzidos. Posteriormente, a água passa pela resina de troca iônica, um sistema com a finalidade de remover íons, abrandador se o objetivo for eliminar cátions, ou deionizador se o objetivo for eliminar cátions e ânions. Neste ponto, é necessário mais um filtro de membrana para retirada de eventuais partículas restantes (RIELLA, 2010; DAUGIRDAS; BLAKE; ING, 2016).

Finalmente a água passa pela osmose reversa, que funciona como barreira contra bactérias e endotoxinas. A água já tratada é armazenada em tanques limpos e então distribuída ao ponto de uso pelo sistema de distribuição de água (PONTORIERO *et al.*, 2003; RIELLA, 2010; DAUGIRDAS; BLAKE; ING, 2016).

Diferentes contaminantes eventualmente encontrados na água tratada para diálise, tais como bactérias heterotróficas, endotoxinas e substâncias químicas, podem ocasionalmente desencadear várias complicações, sendo manifestadas por sinais e sintomas como calafrios, náuseas, cefaleia, febre, insuficiência hepática, hemólise, sepse e até mesmo a morte (SILVA *et al.*, 1996).

### **2.3 CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA E BIOLÓGICA DA ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE**

Bactérias e seus produtos de degradação como endotoxinas são frequentemente encontrados como contaminantes na água tratada para diálise, eventualmente protozoários, vírus e fungos também podem ser encontrados (PONTORIERO *et al.*, 2003). Bactérias gram-negativas e micobactérias não tuberculosas são as mais frequentemente encontradas como contaminantes, existe ainda a possibilidade de outros tipos de microrganismos aumentarem o risco associado ao tratamento, como as cianobactérias (SILVA *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2005).

Em 1996, em Caruaru, Pernambuco, ocorreu um incidente considerado como a "Tragédia da Hemodiálise", com a morte de aproximadamente 60 pessoas, e a qualidade da água usada para filtrar o sangue dos pacientes foi apontada como a causa dos óbitos. Adicionalmente, concluiu-se que as pessoas em tratamento dialítico foram intoxicadas pela microcistina, liberada das cianobactérias quando o cloro foi adicionado ao caminhão-tanque. Na clínica de hemodiálise, a água passou por tratamento, porém o mesmo não apresentava

osmose reversa. Esta situação trágica consistiu em um importante marco para ações de regulamentação sanitária e fiscalização no Brasil (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Também em 1996 ocorreu um surto de bacteremia em um Centro de Hemodiálise em Campinas/SP. Após este episódio, amostras de água e dialisato foram coletadas de diferentes locais do sistema de hemodiálise. Na primeira coleta 80% das amostras apresentaram contagens de *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*, bactérias gram-negativas, ao passo que na segunda coleta 100% das amostras apresentaram contagem de ambas as bactérias (PISANI *et al.*, 2000).

Amostras coletadas pela Vigilância Sanitária de Piracicaba/SP, no ano de 2003, em dois hospitais denominados A e B, analisaram 200 amostras de água tratada para diálise. A unidade A apresentou contagens de leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas acima de 200 unidade formadoras de colônias (UFC)/mL em 5, 14 e 52 amostras, respectivamente para cada um dos contaminantes e nível de contaminações. Enquanto a unidade B apresentou contagens de leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas acima de 200 UFC/mL em 20, 5 e 36 amostras, respectivamente, para cada um dos contaminantes e nível de contaminações (SIMÕES; PIRES, 2004).

Na cidade de Recife /PE, três cepas de *Burkholderia cepacia* foram isoladas tanto de amostras de água tratada para diálise coletadas de vários locais do sistema de água quanto do sangue de pacientes, ambas coletadas durante surto de bacteremia em 2001. Amostras coletadas após a osmose reversa apresentaram contagem bacteriana muito superior às amostras coletadas antes de passarem pela mesma, sugerindo uma possível colonização bacteriana das membranas de osmose reversa. Após a limpeza do sistema de água e a substituição da membrana, o surto cessou (MAGALHÃES *et al.*, 2003).

No passado, o sistema de distribuição de água para o ponto de uso era realizado por tubos de cloreto de polivinila (PVC) longos e com grande diâmetro, com isso o fluxo de água era menor, resultando em aumento da contaminação bacteriana. Atualmente, são preferíveis tubos com diâmetros menores e fabricados com outros materiais, tais como aço inoxidável, fluoreto de polivinilideno (PVDF) e polietileno reticulado (PEX), pois são materiais mais lisos, o que evita a adesão microbiana e facilita a desinfecção. Pontos cegos, zonas de estagnação e tanques reservas também devem ser evitados, pois são potenciais fontes de contaminação (PONTORIERO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 1996).

Com o intuito de prevenir a contaminação neste sistema, uma rotina de desinfecção das tubulações, tanque e máquina de diálise é de fundamental importância (SILVA *et al.*, 1996). Agentes químicos como ácido peracético e hipoclorito, calor e ozônios são muito

utilizados para desinfecção de sistemas de tratamento de água para diálise. Uma desinfecção que englobe todo o sistema é capaz de evitar a formação de biofilmes, mas uma vez presente no sistema sua remoção é muito difícil tornando-se uma fonte de contaminação constante (PONTORIERO *et al.*, 2003).

As bactérias podem ser encontradas de duas formas, isoladas como células independentes que flutuam em meio líquido (planctônica) ou em comunidades de forma aglomerada (bêntica) aderidas a uma superfície sólida chamadas de biofilmes, sendo que 99% das bactérias presentes na natureza estão na forma de biofilmes. Por definição, estes são matrizes poliméricas contendo aglomerados de bactérias e até mesmo fungos em multicamadas unidas entre si por exopolissacarídeos (EPS), produzidos por bactérias. O EPS também proporciona a adesão do biofilme à superfície de um sólido, na maioria dos casos imerso em solução aquosa (PAJKOS; VICKERY; COSSART, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

São inúmeras as dificuldades ocasionadas pelos biofilmes, sua presença em locais indevidos pode causar sérios danos como o entupimento de tubulação em virtude de seu acúmulo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Os biofilmes são a causa da limitação da amostragem de água onde as bactérias coletadas são as planctônicas em vez das bênticas (SANDLE, 2015).

Biofilme é um fator de virulência da bactéria por causa de sua capacidade de aderir fortemente às superfícies. Fator de virulência é uma estratégia que aumenta sua capacidade de promover infecções. Além disso, no interior do biofilme os microrganismos ficam protegidos de desinfetantes, defesas do organismo e antibióticos (PONTORIERO *et al.*, 2003; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os processos infecciosos podem ser considerados como a principal causa de morbidade e mortalidade dos pacientes em tratamento dialítico, ao lado de reações pirogênicas, em razão das endotoxinas presentes quando do tratamento inadequado da água para diálise (ROTH; JARVIS, 2000).

Endotoxinas estão presentes em bactérias gram-negativas, as quais possuem uma membrana externa constituída de lipoproteína, fosfolípídeo e lipopolissacarídeo (LPS). A porção lipídica do LPS, denominada de lipídio A, confere a toxicidade ao mesmo quando liberado na lise da bactéria após sua morte, podendo também ser liberado no decorrer da multiplicação bacteriana (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

No organismo humano, as endotoxinas estimulam a liberação de citocinas pelos

macrófagos, são elas interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), as quais estimulam a febre no hipotálamo. Substâncias que causam febre são denominadas pirogênicos, existindo dois tipos, o endógeno e o exógeno. Pirogênicos exógenos são substâncias estranhas ao organismo, como as endotoxinas, que ao entrarem no organismo ativam pirogênicos endógenos como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (CARVALHO, 2002; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Amostras de água de diálise coletadas na cidade de São Luís/MA, no ano de 2005, em três hospitais denominados de A, B e C, apresentaram endotoxinas em 100% das amostras no pré-tratamento, e nas coletadas pós-tratamento em 33,33%. Quanto a análise bacteriana no hospital B foram isoladas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Alcaligenes xylosoxidans* e *Stenotrophomonas maltophilia*, todas bactérias gram-negativas. No hospital C, por sua vez, foram identificadas cepas de *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia pickettii* e *Flavimonas oryzihabitans*, todas bactérias gram-negativas (LIMA *et al.*, 2005).

Estudo realizado no estado de Mato Grosso do Sul/MS analisou laudos de análises de água do serviço de hemodiálise do período de 2012 e 2013, sendo que 1% a 3% das amostras apresentaram coliformes totais, 1% a 7% estavam acima do permitido pela legislação para bactérias heterotróficas e 6% acima do permitido para endotoxinas. As análises demonstraram, ainda, que 1% das amostras estava contaminado por *Escherichia coli* e 1% por *Pseudomonas aeruginosa*. Como a coleta foi realizada por volta de 15 dias após a limpeza e desinfecção do sistema de tratamento de água, evidenciando que o mesmo não era eficaz (TRISTÃO, 2014).

Amostras de água foram coletadas mensalmente em pesquisa realizada entre 2015 e 2016, em nove enfermarias de diálise em hospitais da Itália, nas quais as tubulações sofriam processo de desinfecção mensal por ácido peracético (0,5%). Todas as amostras apresentam níveis de endotoxina <0,03 unidade de endotoxina (UE)/mL, nível bastante abaixo do máximo permitido, e ausência de fungos, porém duas das nove enfermarias de diálise apresentaram contagens bacterianas. Cabe salientar que, em uma das enfermarias, cepa de *Burkholderia cepacia* foi isolada e na outra cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Para cessar a contaminação foi realizado processo de desinfecção por ácido peracético (2%) e hipoclorito de sódio (2%), seguido de lavagem com água (TOTARO *et al.*, 2017).

## 2.4 LEGISLAÇÃO VIGENTE SOBRE ÁGUA DE DIÁLISE

Os critérios utilizados para a avaliação da água para diálise surgiram em face da conscientização de autoridades competentes quanto ao risco potencial a que pacientes em

tratamento estavam expostos (FARIA, 2011).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 33/2008 dispõe sobre o regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração, avaliação e aprovação dos Sistemas de Tratamento e Distribuição de Água para Hemodiálise no Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008).

A RDC nº 11/2014 dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise, ela se aplica a todos os serviços de diálise públicos, privados, filantrópicos, civis ou militares, incluindo aqueles que exercem ações de ensino e pesquisa. Determina, ainda, que as amostras para fins de análises microbiológicas sejam coletadas mensalmente, no mínimo, no ponto de retorno da alça de distribuição e em um dos pontos na sala de processamento, além de ser verificada a qualidade microbiológica toda vez que ocorrerem manifestações pirogênicas, bacteremias ou suspeitas de sepse em pacientes em tratamentos dialíticos. Esta RDC nº 11/2014 estabelece o padrão de qualidade da água para diálise, podendo-se destacar os atributos biológicos e microbiológicos no Quadro 1.1 (BRASIL, 2014).

Quadro 1.1- Padrão de qualidade biológica e microbiológica da água para diálise

<b>Componente</b>	<b>Valor Máximo Permitido</b>
Contagem de bactérias heterotróficas	100 UFC/mL
Coliformes Totais	Ausência em 100 mL
Endotoxinas	0,25 UE/mL

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2014.

A Organização Internacional de Normalização (ISO), em sua norma 13959:2014 dispõe sobre água para hemodiálise e terapias relacionadas, especificando como padrão de qualidade uma contagem microbiológica total inferior a 100 UFC/mL ou menor se assim disposto em legislação local, e níveis de endotoxinas abaixo de 0,25 UE/mL ou igualmente menor se assim disposto em legislação local (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2014).

## 2.5 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CONVENCIONAIS E ALTERNATIVOS

### 2.5.1 Enumeração de bactérias heterotróficas

Pode-se considerar como marco inicial dos ensaios microbiológicos situação quando em meados de 1610 e em 1665 ocorreu a invenção dos microscópios por Galileu Galilei e Van Leeuwenhoek, respectivamente. Apesar de possivelmente Leeuwenhoek não ter sido o primeiro a observar bactérias e protozoários, foi o primeiro a fazer relatos com desenhos e descrições sobre suas observações. Entre estes, em 1675, descreveu sobre seres vivos presentes na água (DIAS, 2018; PELCZAR; REID; CHAN, 1980).

Embora, cientistas alemães tivessem observado o crescimento de colônias em batatas fervidas, o que caracterizou a prática de cultivo microbiano e o desenvolvimento de meios de cultura. Foi a iniciativa de Koch, que iniciou o cultivo de microrganismos em meio sólido, e denominou como ágar a substância extraída de algas que tinham a capacidade de solidificar a temperatura ambiente. Richard Petri desenvolveu uma placa de vidro para o depósito do meio de cultura (JAY, 2001; PELCZAR; REID; CHAN, 1996).

Passados 200 anos da descoberta dos seres vivos na água por Leeuwenhoek, Louis Pasteur, Robert Koch, Theovald Smith e alguns outros cientistas relacionaram seres microscópicos com as doenças. Joseph Lister, em 1878, obteve as primeiras culturas puras de bactérias por intermédio de diluições seriadas em meio líquido (PELCZAR; REID; CHAN, 1980).

No final do século XIX, técnicas de cultivo foram adotadas para analisar a qualidade da água potável. Para a análise de *E. coli* e outros coliformes, o caldo de cultura, por intermédio do número mais provável (NMP) se tornou o principal método, assim como o meio de cultura de ágar ou meio sólido de Koch para a contagem total, sendo que ambos passaram por poucas modificações. Em 1950 foi introduzido o uso de filtros por membrana para enumeração bacteriana (PELCZAR; REID; CHAN, 1996; SARTORY; WATKINS, 1999).

O NMP é simples, mas requer maior tempo de análise (até 4 dias), ao passo que na filtração por membrana os resultados presuntivos estão disponíveis após 18-24h de incubação. Quanto ao meio sólido, uma das opções consiste no ágar de contagem em placa (PCA), inadequado para recuperação de bactérias já estressadas na água, pobre em nutrientes.

Também podem ser utilizados os meios nutricionalmente mais fracos, por exemplo, Reasoner's 2A Agar (R2A), que recuperam um número maior de bactérias, porém não toda a população viável (SARTORY; WATKINS, 1999).

Atualmente, são muitos os métodos microbiológicos convencionais, tais como método em placa, filtração por membrana e tubos múltiplos pelo processo NMP (BRASIL, 2010). Apesar de serem simples, eficientes e possuírem baixo custo, apresentam algumas limitações, são elas: baixa seletividade do meio de cultura, variabilidade da resposta biológica e resultado tardio na detecção dos microrganismos, comprometendo o tempo hábil para a determinação de medidas preventivas na redução de agravos aos pacientes (BRASIL, 2016).

Na tentativa de minimizar essas limitações, métodos microbiológicos alternativos têm sido desenvolvidos com a finalidade de proporcionar maior nível de qualidade aos testes, maior sensibilidade e resultados mais rápidos, possibilitando que ações corretivas sejam tomadas precocemente.

## 2.5.2 Endotoxinas bacterianas

Theodor Billroth, em 1865, utilizou o termo pirogênio para se referir às substâncias que causavam febre (KIKKERT; GROOT; AARDEN, 2008; MEDICAL STAFF CONFERENCE, 1978). Os estudos de Richard Pfeiffer sobre a cólera, em 1892, os quais eram incentivados por Robert Koch acabaram por consagrá-lo como o pai da endotoxina por sua descoberta (RIETSCHER; CAVAILLON, 2003).

Em 1942 o teste de pirogênio por método *in vivo* foi adicionado na Farmacopeia Americana, em sua décima segunda edição (MC CLOSKY *et al.*, 1943). Desde sua inclusão esse teste vem sendo muito utilizado para avaliação da contaminação de fármacos parenterais por pirogênios (KIKKERT; GROOT; AARDEN, 2008), porém apenas em 1976 o referido teste foi incluído na Farmacopeia Brasileira (NAVEGA *et al.*, 2015).

O teste baseia-se na medição da resposta febril de coelhos após injeção intravenosa da solução teste, sendo que a interpretação dos resultados será utilizada para caracterizar o controle biológico (BRASIL, 2010). Existem, porém, algumas limitações, como manejo dos animais, variabilidade biológica e questões éticas. Tais aspectos encorajaram pesquisadores a desenvolver métodos alternativos ao teste de pirogênio por método *in vivo* (KIKKERT; GROOT; AARDEN, 2008). Em suas pesquisas, Levin e Bang (1964), citados por Kikkert, Groot e Arden (2008), observaram que a endotoxina de *Escherichia coli* causava coagulação na hemolinfa do caranguejo *Limulus polyphemus*.

O teste de Lisado de Amebócitos do *Limulus* (LAL), adicionado na Farmacopeia Americana em 1980, apenas em 1996 foi incluído na Farmacopeia Brasileira (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Existem dois tipos de testes LAL, o primeiro trata-se do teste de coagulação, semiquantitativo, o qual se baseia na formação de gel; o segundo é o fotométrico, quantitativo, que pode ser dividido em método cromogênico que se baseia no desenvolvimento de cor; ou método turbidimétrico que se baseia no desenvolvimento de turbidez (BRASIL, 2010).

Contudo os testes de LAL possuem algumas limitações como a variabilidade da técnica do analista e o erro inerente aos instrumentos utilizados, comprometendo a qualidade das análises, neste contexto métodos alternativos que eliminem essas limitações são desejáveis (BRASIL, 2016; CHARLES RIVER, 2017; LEMGRUBER *et al.*, 2011).

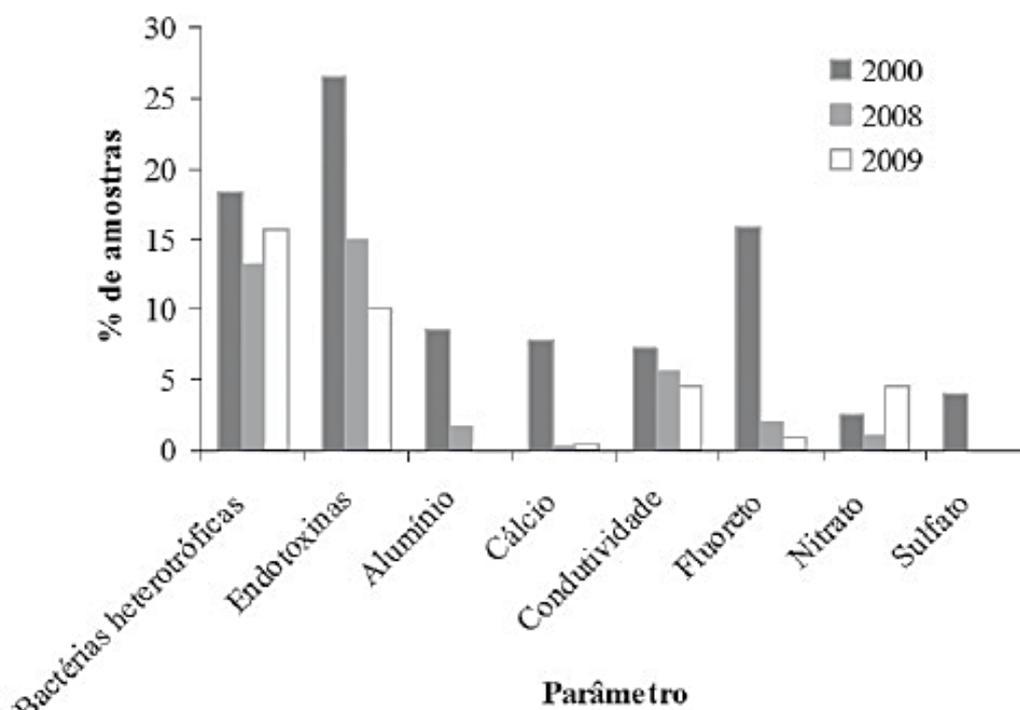
## **2.6 MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE**

O monitoramento tem o intuito de reduzir os riscos ocasionados por microrganismos, proporcionando segurança aos pacientes submetidos ao tratamento de hemodiálise (JASSON *et al.*, 2010; RIEPL *et al.*, 2011). Adicionalmente permitir direcionamento para medidas preventivas em tempo hábil para evitar agravos à saúde do paciente (CUNDELL, 2004).

De acordo com a capacidade do sistema de água e seus indicadores de controle, é importante estabelecer limites de alerta e de ação (CLONTZ, 2009). Entende-se por limite de alerta um sinal, ou seja, um valor que, se ultrapassado, mostra que o processo desviou de sua normalidade; assim, ações corretivas podem ou não ser necessárias. Por outro lado, limite de ação, se ultrapassado, indica que o processo desviou-se da normalidade, exigindo ações corretivas (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Em 1999, o Estado de São Paulo em parceria com o Laboratório Adolfo Lutz implantaram o Programa de Monitoramento da Água Tratada para Hemodiálise. Os resultados obtidos durante os anos de execução deste programa indicam que as Unidades de Diálise do Estado têm implementado ações para garantir o atendimento aos padrões de qualidade da água utilizada nos procedimentos dialíticos, conforme Figura 1.4 (BUZZO *et al.*, 2010).

Figura 1.4- Frequência de parâmetros insatisfatórios obtidos nos programas de monitoramento da água tratada para hemodiálise, no Estado de São Paulo



Legenda: % - porcentagem

Fonte: BUZZO *et al.*, 2010.

Após a determinação da implantação de medidas de vigilância sanitária no Estado do Rio de Janeiro, observou-se melhora da qualidade da água tratada para diálise durante o programa de monitoramento no período de 2006 e 2007 (RAMIREZ, 2009). Entretanto, em monitoramento realizado no estado da Bahia foram obtidos resultados em desacordo com o preconizado em 31% das unidades de terapia de hemodiálise avaliadas (COSTA, 2012).

## 2.7 CONCLUSÃO

Esta revisão bibliográfica nos leva a refletir sobre a necessidade da implantação de monitoramento da água tratada para diálise a nível nacional, por meio de métodos analíticos adequados que forneçam resultados em tempo hábil permitindo que ações corretivas sejam realizadas de imediato proporcionando segurança ao paciente, uma vez que durante esta terapia o paciente necessita de grande volume de água dentro dos padrões de qualidade.

## 2.8 REFERÊNCIAS

AZEVEDO, S. M. F. O.; CAMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAMFET, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, Amsterdam, v. 181-182, p. 441-446, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. v. 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Primeiro Suplemento da Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2016.

BRASIL. Resolução – RDC/ANVISA nº 33, de 3 de junho de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração, avaliação e aprovação dos sistemas de tratamento e distribuição de água para hemodiálise no sistema nacional de vigilância sanitária. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, jun. 2008.

BRASIL. Resolução RDC nº 11, de 13 março 2014. Dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 mar. 2014.

BUZZO, M. L.; BUGNO, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; KIRA, C. S.; CARVALHO, F. H.; SOUZA, A.; SCORSAFAVA, M. A. A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 1-6, 2010.

CARVALHO, A. R. **Mecanismo da Febre**. 2002. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) - Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2002.

CHARLES RIVER. **Endosafe®-PTS™**. Disponível em: [http://www.criver.com/files/pdfs/emd/endotoxin/qc\\_en\\_d\\_endosafe\\_pts\\_datasheet.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/emd/endotoxin/qc_en_d_endosafe_pts_datasheet.aspx). Acesso em: 4 maio 2017.

CLONTZ, L. **Microbial limit and bioburden tests**: validation approaches and global

requirements. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2009.

COSTA, J. S. C. **Proposta de monitoramento da qualidade da água utilizada no tratamento hemodialítico no estado da Bahia**. 2012. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

CUNDELL, A. M. Microbial monitoring of potable water and water for pharmaceutical purposes. *In*: JIMENEZ, L. **Microbial contamination control in the pharmaceutical industry**. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 45-75.

DAUGIRDAS, J. T.; BLAKE, P. G.; ING, T. S. **Manual de diálise**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

DIAS, I. S. **A história do surgimento da microbiologia**: fatos marcantes. Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, UFRJ, 2018. Disponível em: <http://www.microbiologia.ufrj.br/portal/index.php/pt/destaques/novidades-sobre-a-micro/384-a-historia-do-surgimento-da-microbiologia-fatos-marcantes>. Acesso em: 6 maio 2018.

FARIA, P. G. S. **Alternativas para reaproveitamento do rejeito do tratamento de água em clínica de hemodiálise**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Produção Civil) - Departamento Acadêmico de Construção Civil, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2011.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 13959:2014**: water for haemodialysis and related therapies. Geneva: ISO, 2014.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTTENDAELE, M. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. **Food Microbiol.**, London, v. 27, p. 710-730, 2010.

JAY, V. The legacy of Robert Koch. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v. 125, n. 9, p. 1148-1149, 2001.

KIKKERT, R.; GROOT, E. R.; AARDEN, L. A. Cytokine induction by pyrogens: comparison

of whole blood, mononuclear cells, and TLR-transfectants. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 336, p. 45–55, 2008.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy: fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Mosby/ Elsevier, 2009.

LEMGRUBER, A. P. M.; PRESGRAVE, O. A. F.; PRESGRAVE, R. F.; ALVES, E. N.; SILVA, R. S.; GIMENES, I.; FREITAS, J. C. B. R.; CALDEIRA, C. Effect of micropipette inaccuracy on performance of spectrophotometric assay for bacteria endotoxin dosage (chromogenic LAL) employed in products subjected to sanitary surveillance. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 368-372, 2011.

LIMA, J. R. O.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A. G.; SALGADO FILHO, N.; NUNES, P. C.; SILVA, H. S.; MONTEIRO, S. G.; COSTA, J. M. L. Microbiological analysis of water from hemodialysis services in São Luis, Maranhão, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 103-108, 2005.

MAGALHÃES, M.; DOHERTY, C.; GOVAN, J. R. W.; VANDAMME, P. Polyclonal outbreak of Burkholderia cepacia complex bacteraemia in haemodialysis patients. **J. Hosp. Infect.**, New York, v. 54, p. 120-123, 2003.

MC CLOSKEY, W.; PRICE, C. W.; VAN WINKLE, W. J.; WELCH, H.; CALVERY, H. O. Results of the first U.S.P. collaborative study of pyrogens. **J. Am. Pharm. Assoc.**, Washington, v. 32, n. 3, p. 69-73, 1943.

MEDICAL STAFF CONFERENCE. Drug fever. **West J. Med.**, San Francisco, v. 129, p. 321-326, 1978. Disponível em:[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1238351/pdf/westj\\_med00254-0079.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1238351/pdf/westj_med00254-0079.pdf). Acesso em: 7 maio 2018.

NAVEGA, E. C. A.; SILVA, C. C.; PRESGRAVE, O. F.; ALMEIDA, A. S.; DELGADO, I. F.; MATTOS, K. A. Métodos alternativos ao uso de animais para a detecção de pirogênio: oportunidades e desafios no controle da qualidade de produtos biológicos. **Arch. Vet. Sci.**, Curitiba, v. 20, n. 4, p. 71-81, 2015.

PAJKOS, A.; VICKERY, K.; COSSART, Y. Is biofilm accumulation on endoscope tubing a

contributor to the failure of cleaning and decontamination? **J. Hosp. Infect.**, New York, v. 58, p. 224-229, 2004.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1996. v. 1.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980. v. 1.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2015.

PISANI, B.; SIMÕES, M.; PRANDI, M. A. G.; ROCHA, M. M. M.; GONÇALVES, C. R.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 59, n. 1/2, p. 51-56, 2000.

PONTORIERO, G.; POZZONI, P.; ANDRULLI, S.; LOCATELLI, F. The quality of dialysis water. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Berlin, v. 18, suppl. 7, p. vii21–vii25, 2003.

RAMIREZ, S. S. **Água para hemodiálise no estado do Rio de Janeiro: uma avaliação dos dados gerados pelo programa de monitoramento da qualidade nos anos de 2006-2007**. 2009. 54 f. Monografia (Especialização em m Produtos Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional e Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

RIELLA, M. C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

RIEPL, M.; SCHAUER, S.; KNETSCH, S.; HOLZHAMMER, E.; FARNLEITNER, A. H.; SOMMER, R.; KIRSCHNER, A. K. T. Applicability of solid-phase cytometry and epifluorescence microscopy for rapid assessment of the microbiological quality of dialysis water. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Berlin, v. 26, n. 11, p. 3640-3645, 2011.

RIETSCHEL, E. T.; CAVAILLON, J. M. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin. **Microbes Infect.**, Paris, v. 5, p. 1407-1414, 2003.

ROMÃO, J. E. Crônica: definição, epidemiologia e classificação. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v. 26, n. 3, supl. 1, p. 1-3, 2004.

ROTH, V. R.; JARVIS, W. R. Outbreaks of infection and/or pyrogenic reactions in dialysis patients. **Semin. Dial.**, Baltimore, v. 13, n. 2, p. 92-96, 2000.

SANDLE, T. Characterizing the microbiota of a pharmaceutical water system-A metadata study. **SOJ. Microbiol. Infect. Dis.**, Normal, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2015.

SARTORY, D. P.; WATKINS, J. Conventional culture for water quality assessment: is there a future? **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 85, suppl. 1, p. 2258-2338, 1999.

SESSO, R. C.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; LUGON, J. R.; MARTINS, C. T. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2016. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 261-266, 2017.

SILVA, A. M. M.; MARTINS, C. T. B.; FERRABOLI, R.; JORGETTI, V.; JUNIOR, J. E. R. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 180-188, 1996.

SIMÕES, M.; PIRES, M. F. C. Água de diálise: ocorrência de leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 62, n. 2, p. 224-231, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Compreendendo os rins**. São Paulo: SBN, 2018. Disponível em: <https://sbn.org.br/publico/institucional/compreendendo-os-rins/>. Acesso em: 1 maio 2018.

SOCIEDADE DE NEFROLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Especial: hemodiálise no Brasil chega aos 60 anos. **Nefro SP**, São Paulo, v. 5, n. 16, p. 1-12, 2009. Disponível em: <http://www.sonesp.org.br/nefropsp/pdf/090909.pdf>. Acesso em: 2 maio 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOTARO, M.; CASINI, B.; VALENTINI, P.; MICCOLI, M.; GIORGI, S.; PORRETTA, A.; PRIVITERA, G.; LOPALCO, P. L.; A. BAGGIANI, A. Evaluation and control of microbial and chemical contamination in dialysis water plants of Italian nephrology wards. **J. Hosp.**

**Infect.**, New York, v. 97, p. 169-174, 2017.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

TRISTÃO, A. M. V. **Qualidade da água nas clínicas de hemodiálise no estado de Mato Grosso do Sul**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.



# *3 Capítulo II\**

**VALIDAÇÃO E APLICABILIDADE DE UM MÉTODO ALTERNATIVO NO  
MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E  
DIALISATO**

---

\* A informação contida neste capítulo foi submetida para apresentação modalidade pôster no congresso: XX Congresso Farmacêutico de São Paulo e está sendo formatada a fim de submissão no periódico Brazilian Journal of Nephrology (conceito Qualis 2016: B3 Farmácia)



### 3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente os pacientes com diagnóstico de doenças renais crônicas podem ser submetidos a Terapia Renal Substitutiva (TRS), sendo opções a modalidade de diálise peritoneal, a hemodialise ou até mesmo o transplante renal, dependendo do estágio e evolução da doença (DAUGIRDAS; BLAKE; ING, 2016; ROMÃO, 2004).

A hemodialise é um procedimento amplamente empregado e durante o tratamento os pacientes são expostos a um grande volume de água. Caso esta deixe de atender aos padrões de qualidade exigidos pelos órgãos fiscalizadores acarretam riscos aos pacientes podendo levar a óbito (RIELLA, 2010; SESSO *et al.*, 2017; VASCONCELOS, 2012).

Contaminantes químicos e microbianos podem ser prejudiciais ao paciente em tratamento hemodialítico (PONTORIERO *et al.*, 2003). Quanto aos químicos pode-se destacar o alumínio, cloramina, fluoreto, cobre e zinco, enquanto que os microrganismos mais frequentes encontradas como contaminantes em sistema de água são *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Serratia*, todas bactérias gram-negativas, e *Mycobacterium* (DAUGIRDAS; BLAKE; ING, 2016; SILVA *et al.*, 1996).

Dentre os componentes oriundos das membranas de bactérias gram-negativas pode-se destacar o risco trazido pela endotoxina, termo que faz referência ao complexo lipopolissacarídeo (LPS). Este possui uma porção lipídica, o lipídeo A, que confere toxicidade durante a lise e morte da bactéria e no decorrer da multiplicação da mesma (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Endotoxinas possivelmente presentes no dialisato podem não ser retidas pela membrana do dialisador caso esta não esteja íntegra, chegando à corrente sanguínea do paciente e resultando em reação pirogênica, com o estímulo da liberação de citocinas pelos macrófagos (COULLIETTE; ARDUINO, 2013; WARD, 2004).

Nos Estados Unidos da América houve seis surtos de contaminação por endotoxinas entre os anos de 1973 e 1987, totalizando 177 pacientes acometidos, porém não foi registrado óbito (COULLIETTE; ARDUINO, 2013). Em estudo realizado em 30 centros de diálise na Alemanha observou-se que 12,2% das amostras de água e 27,5% das amostras de dialisato apresentaram concentração de endotoxina maior que 5 UE/mL (BAMBAUER *et al.*, 1994).

No Brasil, na cidade de São Luis/MA ao analisar água de diálise observou-se que em 100% e 33,33% das amostras apresentaram endotoxina tanto no pré como pós tratamento, respectivamente (LIMA *et al.*, 2005).

Tais incidentes permitem portanto concluir que a unidade de hemodiálise, além de garantir uma água de qualidade, deve também possuir um protocolo bem estabelecido de desinfecção das máquinas, pois os concentrados de bicarbonato, componente da solução de diálise, são passíveis de contaminação bacteriana e elevação dos níveis de endotoxina (DAUGIRDAS; BLAKE; ING, 2016).

A glicose pode estar presente na solução de diálise a fim de permitir o controle dos níveis glicêmicos e otimizar o tratamento da diabetes, mas assim como o bicarbonato consiste em fonte de carbono e sua presença não só pode aumentar a contaminação por bactérias mas também a concentração de endotoxinas (BURMEISTE; CAMPOS; MILTERSTEINER, 2012; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A escolha de métodos analíticos sensíveis e específicos para análise de água é essencial para se obter água de qualidade e proporcionar a segurança do paciente (PARVEEN *et al.*, 2011). Desde 1980 a Farmacopeia Americana descreve o Teste de Lisado de Amebócito do *Limulus* (LAL) como método para análise de endotoxinas em produtos farmacêuticos, substituindo, em grande proporção, o emprego de coelhos no teste de pirogênio. Embora com abrangência, conceitos e escopos distintos, o ensaio de endotoxinas bacterianas substituiu e suplanta as vantagens, na maior parte das situações, do teste de pirogênio *in vivo* (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A Farmacopeia Brasileira preconiza dois tipos de testes de determinação de endotoxina: semiquantitativo, coagulação em gel; e quantitativo, fotométrico, o qual pode ser dividido em turbidimétrico ou cromogênico (BRASIL, 2010).

Estudo realizado por Lemgruber *et al.* (2011) determinou que o erro inerente a pipetagem interfere no resultado do método cromogênico podendo comprometer a confiabilidade dos resultados. A variabilidade da técnica do analista também é um fator que pode interferir nos testes de LAL (CHARLES RIVER, 2017).

Na tentativa de contornar as diferentes limitações metodológicas, métodos alternativos têm sido desenvolvidos com a finalidade de proporcionar maior nível de qualidade dos resultados obtidos, maior sensibilidade e agilidade, possibilitando que ações corretivas sejam tomadas precocemente (BRASIL, 2016).

O método alternativo deve possuir atributos como: menor tempo de execução da análise, liberação de resultados em menor tempo, automação, fácil execução, ser miniaturizado, possuir baixo custo e atender aos parâmetros analíticos (JASSON *et al.*, 2010). Neste contexto pode-se destacar o *Portable Test System* (PTS<sup>®</sup>), o qual adota um espectrofotômetro portátil desenvolvido para simplificar a manipulação da amostra e

preparação de padrões a cada teste, seja para construção da curva padrão ou para testes das amostras. Quantidades precisas de reagente LAL, de endotoxina e de substratos cromogênicos são fixadas em um cartucho totalmente apirogênico, eliminando a variabilidade da técnica. Por se tratar de um sistema miniaturizado pode ser transportado até o ponto de coleta, fornecendo resultados precisos em tempo real (CHARLES RIVER, 2017).

Entretanto, a implantação de métodos alternativos deve ser precedida por uma validação criteriosa (BRASIL, 2016). A palavra validar traduz o ato de documentar que determinado procedimento é eficaz e adequado ao seu objetivo (PARENTAL DRUG ASSOCIATION, 2013). Para que uma validação seja considerada satisfatória é necessário que alguns passos sejam executados com maestria, podendo-se destacar a qualificação do delineamento, de instalação, operacional e de performance (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

No âmbito do presente trabalho, características intrínsecas do equipamento e atribuições do seu fabricante conduziram ao direcionamento à qualificação de performance.

A qualificação de performance engloba a comprovação de que o método alternativo é adequado ao uso na rotina respeitando os critérios de validação, os quais são regulados por farmacopeias e organizações internacionalmente conhecidas, como por exemplo o *Parenteral Drug Association* (PDA) (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). As recomendações dos critérios a serem analisados depende do tipo de análise: qualitativa, quantitativa ou de identificação (BRASIL, 2016). Os dados do Quadro 2.1 mostram a comparação dos critérios de validação recomendados por tipo de análise pelas Farmacopeias Americana e Brasileira e pelo *Technical Report* n. 33, publicado pelo PDA.

Quadro 2.1- Critérios de validação indicados considerando tipo de análise pela Farmacopeia Americana, *Technical Report* n. 33 e Farmacopeia Brasileira

Critérios	Farmacopeia Americana		Technical Report, n. 33		Farmacopeia Brasileira		
	Testes quantitativos	Testes qualitativos	Testes quantitativos	Testes qualitativos	Testes quantitativos	Testes Qualitativos	Testes de identificação
<b>Exatidão</b>	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
<b>Precisão</b>	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
<b>Especificidade</b>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Limite de detecção</b>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
<b>Limite de quantificação</b>	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
<b>Linearidade</b>	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
<b>Intervalo</b>	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
<b>Robustez</b>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Resistência</b>	Sim	Sim	Sim	Sim	-	-	-
<b>Equivalência</b>	Sim	Sim	Sim	Sim	-	-	-
<b>Repetibilidade</b>	Sim	Sim	-	-	-	-	-

Legenda: (-) não possui

Fonte: BRASIL, 2016; Adaptado de Parenteral Drug Association PDA, 2013 e adaptado UNITED STATES PHARMACOPEIA-USP, 2017.

Se comprovado que o método alternativo é equivalente, superior ou não inferior ao método convencional em uso a substituição do mesmo é aceita e estimulada pelos órgãos regulatórios de alguns locais como Austrália, Europa, Japão e Estados Unidos (PDA, 2013).

Neste contexto, o presente trabalho teve por finalidade validar o PTS<sup>®</sup> e avaliar sua aplicabilidade no monitoramento da água tratada para diálise e do dialisato durante um mês em uma unidade de diálise.

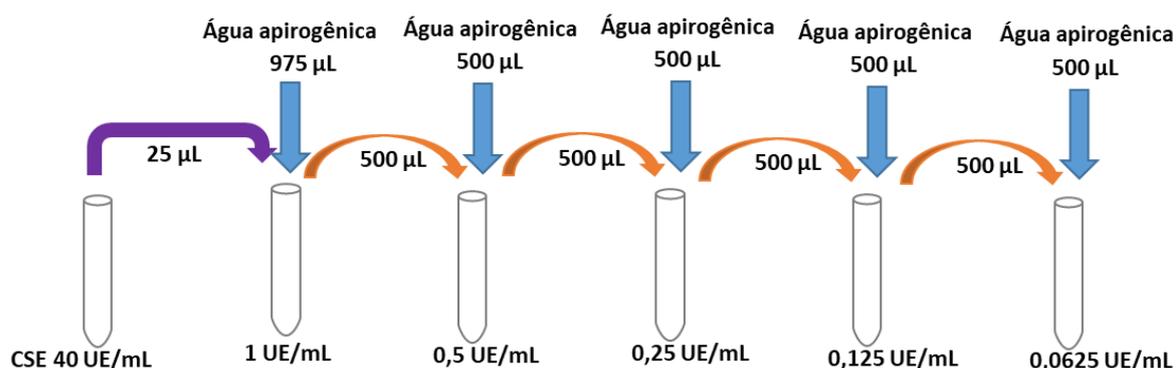
## 3.2 MATERIAL E MÉTODO

### 3.2.1 Validação

A fim de validar o PTS<sup>®</sup> a endotoxina padrão de *Escherichia coli* (CSE) foi diluída com água grau reagente LAL em cinco concentrações (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 UE/mL), as quais foram analisadas pelo método convencional e alternativo (Figura 2.1). Para a preparação das diluições o frasco de CSE foi agitado vigorosamente antes do uso por pelo

menos 3 minutos e então realizadas as diluições seriadas, agitando-se no mínimo 30 segundos após cada diluição (BRASIL, 2010).

Figura 2.1- Representação das diluições da endotoxina padrão de *Escherichia coli* em cinco concentrações



Legenda: CSE - endotoxina padrão de *Escherichia coli*; UE - unidade de endotoxina; µL - Microlitro

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

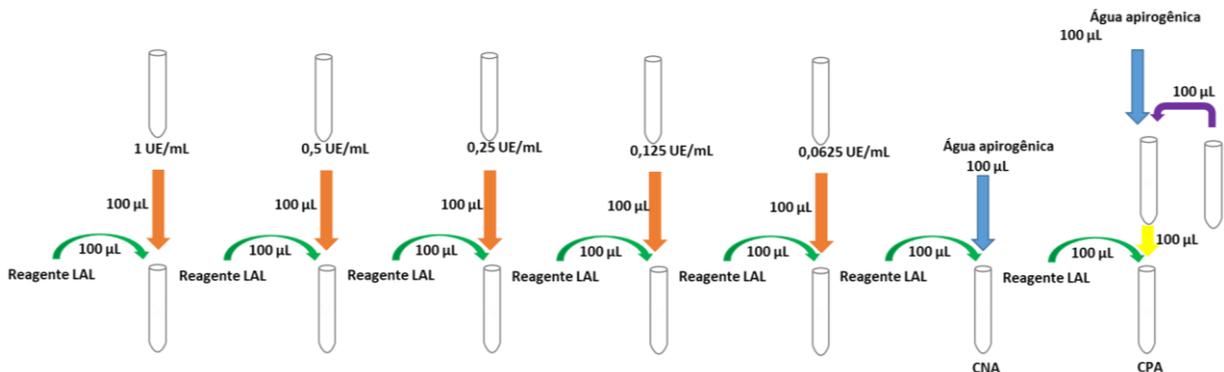
Adicionalmente, foi preparada a CSE na concentração de  $2\lambda$  (sendo  $\lambda$  a sensibilidade rotulada do reagente de LAL) para a realização do controle positivo do produto (CPP) e controle positivo da água grau reagente LAL (CPA), (BRASIL, 2010).

### *Metodologia convencional*

A metodologia convencional adotada foi a de coagulação em gel. Primeiramente foi realizada a preparação do reagente LAL, onde o conteúdo do frasco foi reconstituído com água grau reagente LAL livre de endotoxinas, conforme orientações do fabricante, e armazenado em freezer até o momento de uso.

Em sete tubos de ensaio apirogênico foi colocado volume de 100 µL de reagente LAL, sendo que em cinco deles foi adicionado volume de 100 µL de cada diluição da amostra, em um sexto tubo adicionou-se volume de 100 µL de água grau reagente LAL para o controle negativo da água grau reagente LAL (CNA), e em um sétimo tubo foi realizado o CPA, onde adicionou-se volume de 100 µL de uma solução de 100 µL de água grau reagente LAL mais volume de 100 µL de CSE na concentração de  $2\lambda$  (Figura 2.2) (BRASIL, 2010).

Figura 2.2- Representação esquemática do teste de coagulação em gel



Legenda: UE - unidade de endotoxina; µL – Microlitro; LAL - Lisado de Amebócitos do Limulus; CNA - controle negativo da água grau reagente LAL; CPA - controle positivo da água grau reagente LAL

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Em seguida os tubos foram incubados em banho-maria por 1 hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , isento de vibrações. Após este período foi feita a leitura, a reação foi considerada positiva quando da formação de um gel firme, que permaneceu quando o tubo é invertido ( $180^{\circ}$ ). Foi considerado resultado negativo quando da ausência de gel ou pela formação de material viscoso que não manteve sua integridade quando o tubo foi invertido ( $180^{\circ}$ ) (BRASIL, 2010).

#### *Método alternativo*

O método alternativo de escolha foi o sistema Endosafe-PTS<sup>®</sup> e o cartucho que se julgou mais adequado, devido ao limite de endotoxina permitido por legislação para amostras de água de diálise foi o que apresentava sensibilidade de 0,05 - 5 UE/mL.

Após a inserção do cartucho no aparelho foi pipetado volume de 25 µL de cada diluição e transferido para cada um dos quatro reservatórios. Cada reservatório possui um canal, em dois destes canais a amostra reage com o reagente LAL e um substrato cromogênico (ambos presentes no cartucho), nos outros dois foi realizado CPP, pois além do reagente de LAL contém 0,69 UE/mL de endotoxina. A densidade óptica dos poços é analisada contra uma curva padrão arquivada internamente (CHARLES RIVER, 2017). As análises foram realizadas por dois analistas diferentes, sendo que cada um analisou os dados em triplicata (três cartuchos por diluição) perfazendo um total de seis réplicas.

Os resultados foram analisados conforme os critérios de aceitação descritos no Quadro 2.2.

Quadro 2.2- Descrição dos parâmetros, formas de análise e critérios de aceitação para validação de métodos microbiológicos e biológicos alternativos

<b>Parâmetros</b>	<b>Forma de análise</b>	<b>Critérios de aceitação</b>
Exatidão	Determinação da porcentagem de recuperação.	A recuperação do método alternativo deve ser de $100 \pm 30\%$ em relação ao convencional.
Precisão	Determinação do coeficiente de variação.	O coeficiente de variação deve ser menor que 30%.
Especificidade	Interpretação dos resultados.	O método deve ser capaz de apresentar resultados positivos para os diferentes microrganismos presentes na amostra.
Limite de detecção	Interpretação dos resultados. Seguido de teste de Chi-quadrado.	Pelo menos 50% dos resultados positivos no método convencional devem ser positivos na metodologia alternativa.
Limite de quantificação	Interpretação dos resultados.	O método alternativo deve ser capaz de determinar a menor carga microbiana com precisão e exatidão.
Linearidade	Cálculo do quadrado do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) por meio de análise de regressão linear dos dados.	O método alternativo não deve apresentar coeficiente de correlação menor do que 0,95.
Intervalo	Interpretação dos resultados.	Determinado com base nos estudos de precisão, exatidão e linearidade.
Resistência	Comparação entre as réplicas do mesmo analista e entre os analistas.	O método alternativo deve fornecer resultados reprodutíveis mesmo com alterações nas condições como diferentes analistas e períodos diferentes.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2016; USP, 2017.

### 3.2.2 Aplicabilidade do método alternativo

Amostras de água tratada para diálise e dialisato foram analisadas quanto à presença de endotoxina bacteriana. A água foi coletada de quatro pontos diferentes no sistema: pós-osmose reversa, canalização de drenagem no fundo do tanque de armazenamento, reuso e alça de distribuição (*loop*). Enquanto que o dialisato foi coletado de quatro máquinas de diálise em funcionamento distribuídas em diferentes salas da unidade em estudo.

As amostras foram coletadas em uma unidade de diálise do interior do Estado de São Paulo, em embalagens apirogênicas e foram transportadas para capital do estado em caixas de isopor com gelo reutilizável.

Com o intuito de realizar o monitoramento desta unidade durante um mês foram realizadas quatro coletas consecutivas, sendo a primeira na semana que antecedeu a desinfecção química do sistema de água com ácido peracético 0,2%, a qual é realizada uma vez por mês.

Em tubos de ensaio apirogênicos foi colocado volume de 100 µL de reagente LAL e adicionado volume de 100 µL de cada amostra diluída na concentração de 1:2 com água grau reagente LAL, segundo cálculo da máxima diluição válida (MDV), pois a sensibilidade declarada do reagente de LAL utilizado foi de 0,125 UE/mL e o limite de endotoxina permitido para água tratada para diálise é de 0,25 UE/mL (BRASIL, 2014).

$$MDV = \frac{\text{limite de endotoxina}}{\lambda}$$

Onde  $\lambda$  é a sensibilidade do reagente de LAL expressa no rótulo do frasco.

Fonte: BRASIL, 2010

As amostras do dialisato foram diluídas nesta mesma concentração. As análises foram realizadas em triplicata (três cartuchos por amostra).

Realizou-se ainda o CNA e CPA conforme descrito anteriormente, adicionalmente realizou-se o CPP, onde volume de 100 µL de uma solução de 100 µL de amostra mais volume de 100 µL de CSE na concentração de 2  $\lambda$  foram adicionados em tubos contendo volume de 100 µL de reagente LAL.

Em seguida os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C  $\pm$  1°C por 1 hora, evitando vibrações. Após este período foi feita a leitura. As amostras que apresentaram resultado positivo para 0,25 UE/mL foram submetidas as análises adicionais a fim de verificar se os níveis de endotoxina estavam na faixa de 0,25 - 0,35 UE/mL ou superior a 0,5 UE/mL.

Paralelamente volume de 25 µL de cada amostra (não diluída) foi pipetado nos quatro reservatórios, em cada um dos cartuchos do PTS<sup>®</sup> (triplicata) a fim de realizar um comparativo com o método convencional.

#### *Análise estatística*

Para as análises estatísticas utilizou-se o *software* Minitab<sup>®</sup> 17.

### **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.3.1 Validação**

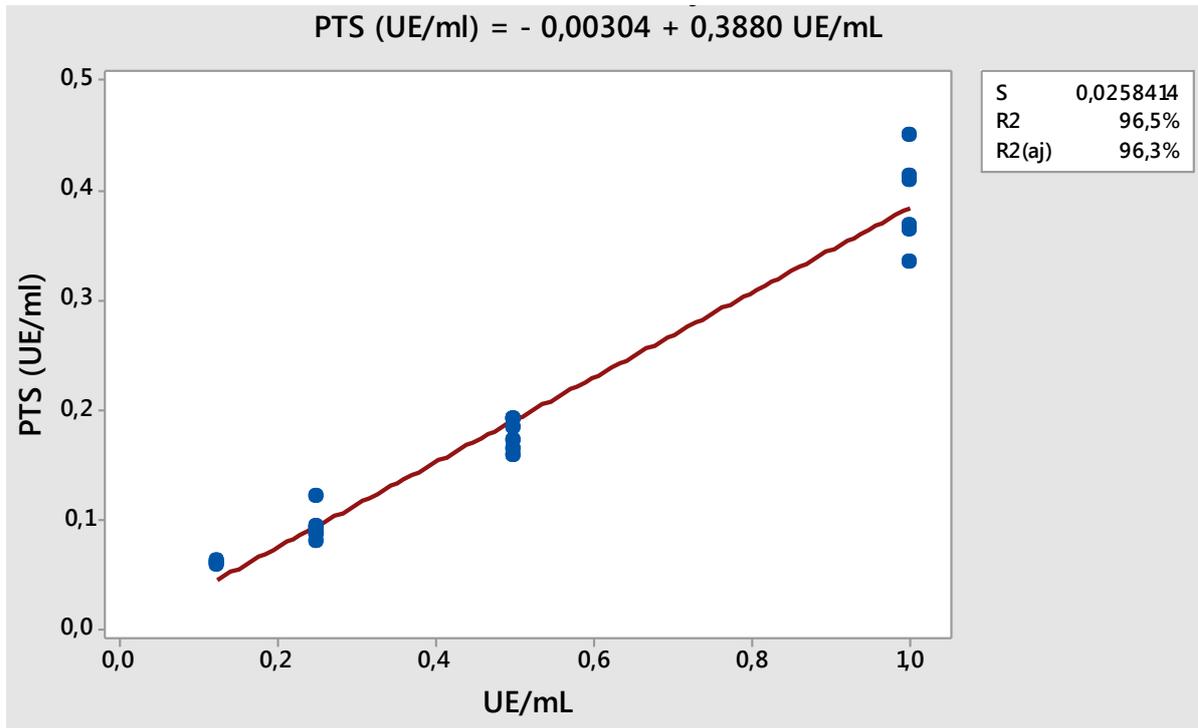
Uma limitação observada durante a realização das análises foi a não detecção, em nenhuma das réplicas, da última concentração analisada, 0,0625 UE/mL, pois o equipamento indicou estar abaixo do limite de detecção, portando a mesma não foi utilizada para a realização dos testes estatísticos.

#### *Linearidade*

Na análise de regressão linear (Figura 2.3) foi possível observar que houve boa correlação entre as duas variáveis, pois o  $R^2$  foi superior a 0,95, sugerindo que os resultados possuem linearidade (BRASIL, 2016). Estes dados vêm corroborar com pesquisa anteriormente realizada onde o PTS também apresentou boa linearidade (SANTOS-OLIVEIRA, 2009).

Como a análise de variância (ANOVA) da regressão apresentou o valor-P, o qual mede a força de evidência dos dados, menor que o nível de significância de 0,05 pode-se dizer que a equação da reta foi confirmada por este teste e a mesma é significativa.

Figura 2.3- Representação linear dos resultados de validação



### Exatidão

Na Tabela 2.1 é possível observar que os dados não estão dentro do preconizado para serem exatos, pois a porcentagem de recuperação deveria ser de  $100 \pm 30\%$  (BRASIL, 2016).

Tabela 2.1- Distribuição dos resultados do método convencional em relação ao alternativo

Método Convencional (UE/mL) \ Método Alternativo (UE/mL)	Método Convencional (UE/mL)			
	1	0,5	0,25	0,125
<b>Replica 1</b>	0,336	0,173	0,089	<0,050
<b>Replica 2</b>	0,451	0,165	0,121	0,063
<b>Replica 3</b>	0,365	0,185	0,092	0,061
<b>Replica 4</b>	0,410	0,158	0,093	<0,050
<b>Replica 5</b>	0,413	0,193	0,087	<0,050
<b>Replica 6</b>	0,369	0,193	0,080	0,059
Média	<b>0,391</b>	<b>0,178</b>	<b>0,094</b>	<b>0,061</b>
Porcentagem média de recuperação	<b>39,1</b>	<b>35,6</b>	<b>37,6</b>	<b>48,8</b>

**Nota:** Os dados com “<” não foram incluídos nos cálculos de média e desvio padrão;

Ao aplicar a equação da reta obtida por regressão linear a fim de corrigir os dados, observou-se que os valores ficaram dentro do limite aceitável, exceto a concentração de 0,125 UE/mL (Tabela 2.2). Portanto pode-se considerar que as concentrações de 1UE/mL a 0,25

UE/mL são exatas. Em estudo realizado anteriormente o PTS apresentou resultados significativamente diferentes entre a concentração da amostra e a leitura realizada pelo equipamento, o que comprometeu a aprovação deste critério (SANTOS-OLIVEIRA, 2009).

Tabela 2.2- Resultados obtidos da validação do método alternativo após correção com a equação da reta obtida por regressão linear

Método Convencional (UE/mL) \ Método Alternativo (UE/mL)	1	0,5	0,25	0,125
<b>Replica 1</b>	0,874	0,454	0,237	< 0,14
<b>Replica 2</b>	1,170	0,433	0,320	0,170
<b>Replica 3</b>	0,949	0,485	0,245	0,165
<b>Replica 4</b>	1,065	0,415	0,248	< 0,14
<b>Replica 5</b>	1,072	0,505	0,232	< 0,14
<b>Replica 6</b>	0,959	0,505	0,214	0,160
Média	1,015	0,466	0,249	0,165
Porcentagem média de recuperação	<b>101,5</b>	<b>93,2</b>	<b>99,5</b>	<b>132</b>

Nota: Os dados com "<" não foram incluídos nos cálculos de média e desvio padrão;

### *Precisão*

As concentrações de 1 UE/mL a 0,125 UE/mL atendem ao critério de precisão, ou seja, todos são menores que 30% (Tabela 2.3) (BRASIL, 2016). Estudos realizados anteriormente também relataram que o PTS<sup>®</sup> foi preciso (FUKUMORI, 2008; SUZUKI *et al.* 2016).

Tabela 2.3- Coeficiente de variação dos dados de validação corrigidos pela equação da reta

Concentração de endotoxina (UE/mL) \ Método Alternativo (UE/mL)	1	0,5	0,25	0,125
<b>Média</b>	1,015	0,466	0,249	0,165
<b>Desvio padrão</b>	0,107	0,038	0,037	0,005
<b>Coeficiente de variação (%)</b>	10,55	8,17	14,65	3,12

### *Especificidade*

Para este critério utilizou-se apenas as concentrações que foram exatas. Após a correção dos dados, o limite de sensibilidade do cartucho de 0,050 UE/mL passou a ser 0,14 UE/mL.

Na Tabela 2.2 pode-se observar ainda que o método alternativo em estudo caracterizou-se por apresentar resultados positivos nas concentrações maiores que sua sensibilidade (1,0; 0,5; 0,25 UE/mL). Esta coerência de resultados conduz a caracterização de sua especificidade (BRASIL, 2016).

#### *Limite de detecção*

Os dados da Tabela 2.2 expressam que a concentração de 0,125 UE/mL foi a menor que apresentou 50% dos resultados positivos, sendo portanto o limite de detecção do método alternativo em estudo. A Farmacopeia Brasileira recomenda o teste de Chi-quadrado a fim de avaliar a não inferioridade frente ao método tradicional, porém não foi possível realizar esta análise estatística pois o mesmo pode falhar quando aplicado em pequenas amostras (BRASIL, 2016; CONTADOR; SENNE, 2016).

#### *Limite de quantificação*

Os dados da Tabela 2.3 mostram que a menor concentração determinada com precisão foi a de 0,125 UE/mL, por outro lado ao analisar os dados da Tabela 2.2 pode-se observar que a menor concentração determinada com exatidão foi a de 0,25 UE/mL (BRASIL, 2016). Portanto o limite de quantificação do método alternativo em estudo é 0,25 UE/mL.

#### *Intervalo*

Com base nos resultados dos critérios de precisão, exatidão e linearidade pode-se determinar que o método alternativo apresenta o intervalo de 0,25 UE/mL a 1,0 UE/mL (BRASIL, 2016).

#### *Resistência*

Por meio da proximidade do desvio padrão dos dois analistas (Tabela 2.4) e considerando que o coeficiente de variação de ambos mostrou-se acima de 0,95, (Figura 4) pode-se dizer que o método alternativo forneceu resultados reprodutíveis, o que conduz a caracterização de sua resistência (USP, 2017).

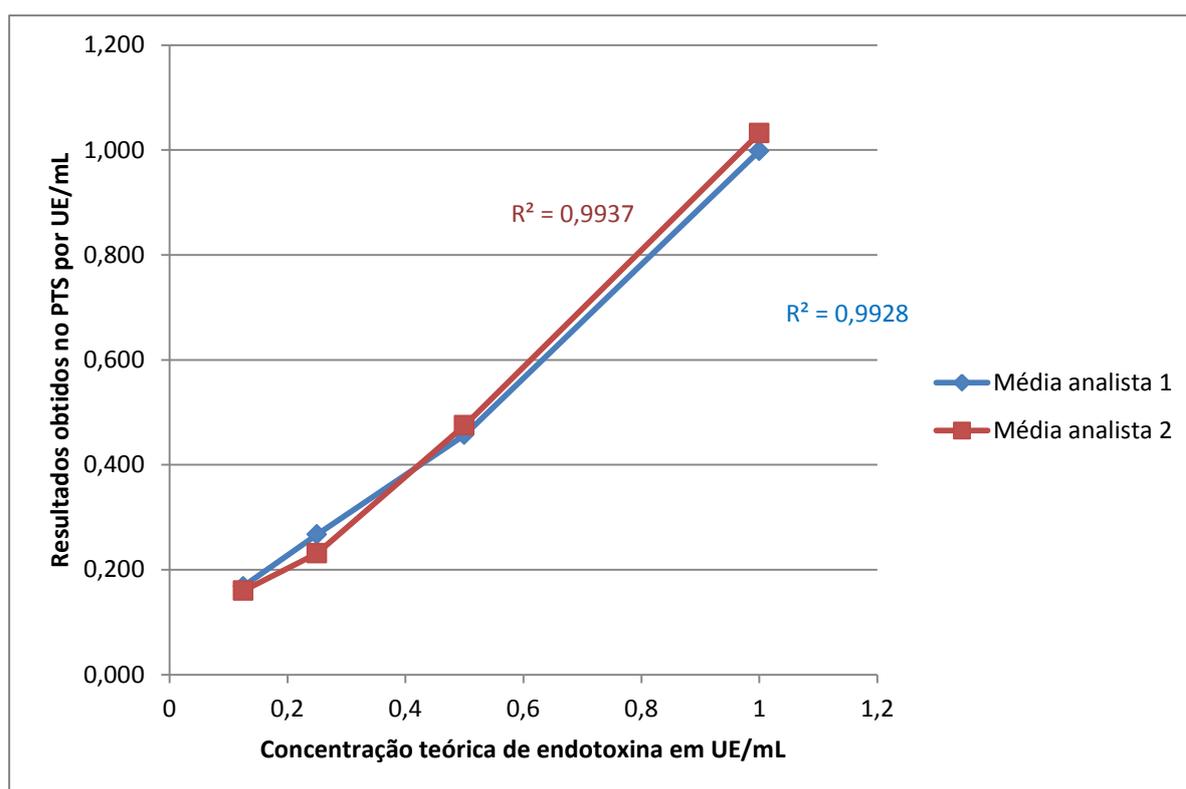
Tabela 2.4- Distribuição dos dados das análise do método convencional e alternativo por dia e analistas

Método Convencional (UE/mL) \ Método Alternativo (UE/mL)	Analista 1				Analista 2			
	1	0,5	0,25	0,125	1	0,5	0,25	0,125
Dia 1	0,874	0,454	0,237	<0,14	1,065	0,415	0,248	<0,14
Dia 2	1,170	0,433	0,320	0,170	1,072	0,505	0,232	<0,14
Dia 3	0,949	0,485	0,245	0,165	0,959	0,505	0,214	0,160
Média	0,998	0,457	0,267	0,168	1,032	0,475	0,231	0,160
Desvio Padrão	0,154	0,026	0,046	0,004	0,063	0,052	0,017	-

Legenda: “-” calculo não realizado

Nota: Os dados com “<” não foram incluídos nos cálculos de média e desvio padrão;

Figura 2.4- Comparação das médias dos dois analistas dos resultados obtidos pelo PTS<sup>®</sup>



Como para a implantação de métodos alternativos há necessidade de criteriosa validação, as informações acima obtidas permitem dizer que o método alternativo, PTS<sup>®</sup>, está validado para amostras com expectativa de ausência de endotoxinas ou níveis de 0,25 UE/mL a 1,0 UE/mL, ou seja, julga-se ser eficaz e adequado ao objetivo de sua aplicabilidade no monitoramento da água tratada para diálise e dialisato (BRASIL, 2016; PDA, 2013).

### 3.3.2 Aplicabilidade do método alternativo

Na Tabela 2.5 estão expressas as médias dos resultados das análises realizadas pelo método convencional e alternativo em amostras de água tratada para diálise, percebe-se que todos os resultados, independentemente do método utilizado, estão de acordo com a legislação vigente, menor que 0,25 UE/mL (BRASIL, 2014). Estes achados vêm ao encontro de um estudo realizado em Curitiba/PR cuja finalidade era avaliar a qualidade da água de seis centros de diálise por 12 meses, onde 85% das amostras de água tratada para diálise estavam de acordo com a legislação vigente (FIGEL, 2011).

Ao analisar as amostras de dialisato (Tabela 2.5), houve uma limitação ao determinar se os resultados estão de acordo com a legislação vigente sobre Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise, pois esta apenas determina que as amostras de dialisato devem ser coletadas mensalmente para contagem de bactérias heterotróficas, não determinando análise de endotoxinas (BRASIL, 2014).

Tabela 2.5- Comparação das médias do nível de endotoxina pelo método convencional e alternativo das amostras de água tratada para diálise e dialisato

Coleta	Método	Nível de endotoxina (UE/mL)							
		Água tratada para diálise				Dialisato			
		Osrose	Tanque	Reuso	Loop	Máq. 1	Máq. 2	Máq. 3	Máq. 4
1	Convencional	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,25
	Alternativo	<0,14	<0,14	0,140	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14
2	Convencional	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	< 0,25	0,35> <0,5	< 0,25	< 0,25
	Alternativo	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	0,17	0,230	<0,14
3	Convencional	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	>0,5	< 0,25	< 0,25	>0,5
	Alternativo	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	24,784	<0,14	<0,14	0,974
4	Convencional	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,25	>0,5
	Alternativo	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	1,165

Legenda: máq= máquina;

Apesar da RDC Nº 11 de 2014 não mencionar a concentração máxima de endotoxina permitida, este estudo utilizou para fins de análise o conceito de dialisato, como sendo o resultado da diluição, nas proporções adequadas para uso, do concentrado polieletrólítico para hemodiálise em água tratada para diálise (BRASIL, 2014).

A RDC Nº 8, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação do Concentrado Polieletrólítico para Hemodiálise e determina que a concentração máxima de

endotoxina é de 0,5 UE/mL até o prazo de validade estabelecido pelo fabricante (BRASIL, 2001). Portanto, pode-se admitir uma predição para um limite máximo de endotoxina de 0,75 UE/mL (0,5UE/mL +0,25 UE/mL).

Para a defensabilidade de uma simples soma, desconsiderando a proporção entre água e concentrado polieletrolítico, pode-se considerar como precedente o fato de que na RDC Nº 11 de 2014 está disposto que para o dialisato o máximo permitido para enumeração de bactérias heterotróficas é de 200 UFC/mL, aparentemente uma soma do máximo permitido para água tratada para diálise, 100 UFC/mL, expresso na mesma legislação, e máximo permitido para o concentrado polieletrolítico, 100 UFC/mL, expresso na RDC Nº 8 de 2001 (BRASIL, 2001, 2014).

Considerando-se este limite calculado, três amostras estariam fora do limite de especificação, no entanto não houve relatos de reações pirogênicas, possivelmente pelo fato de que o dialisato foi coletado da mangueira de entrada do dialisador com membrana de polisulfona, a qual possui capacidade de reter endotoxinas (FRESENIUS, 2019). Estes dados corroboram com pesquisa anterior ao comparar dois tipos de membranas de dialisadores, polisulfona e polietersulfona, que concluíam que ambas são eficazes para impedir a passagem de endotoxinas possivelmente presentes no dialisato (LONNEMANN *et al.*, 2001).

Sabendo do potencial da membrana de polisulfona, autores testaram membranas deste material de diferentes marcas e observaram que existe diferença de permeabilidade entre as mesmas, sendo recomendável avaliação do desempenho pelos fabricantes (BOMMER; BECKER; URBASCHEK, 1996). O reprocessamento dos dialisadores pode comprometer a qualidade da membrana podendo alterar a permeabilidade da mesma (COULLIETTE; ARDUINO, 2013)

Estudo realizado em 30 centros de diálise na Alemanha analisou a concentração de endotoxina na água tratada para diálise e dialisato, a qual variou de 0 a 95 UE/mL e 0 a 487 UE/mL, respectivamente. Os autores argumentam negativamente sobre os elevados níveis, propondo regulamentação mais criteriosa. O trabalho não faz entretanto referência a reutilização de dialisadores (BAMBAUER *et al.*, 1994).

No Brasil, na cidade de Ponta Grossa/PR foi realizado uma pesquisa para determinar a qualidade da água e do dialisato de 62 amostras coletadas do sistema de hemodiálise, nos meses de novembro de 2003 a abril de 2004, e observou-se presença de endotoxinas apenas nas amostras que antecedem a osmose reversa (BORGES *et al.*, 2007).

Em estudo realizado na Lituânia em que se analisou amostras de água tratada para diálise e dialisato quanto a presença de endotoxina, observou-se que 86% das amostras de

água tratada para diálise e 92% das amostras de dialisato apresentaram níveis de endotoxinas inferiores a 0,25 UE/mL, estando de acordo com a Farmacopéia Européia e o *European Best Practice Guidelines for pure dialysis fluid*. O estudo relata ainda, que estas porcentagens poderiam ser maiores se fosse estabelecido um monitoramento frequente dos níveis de endotoxinas (SKARUPSKIENÉ *et al.*, 2010).

Klein *et al.* (1990) após realizarem um estudo a respeito da qualidade da água tratada para diálise e dialisato em 51 centros de diálise nos Estados Unidos ressaltam a necessidade de monitoramento regular dos níveis de endotoxina no dialisato. O que vem de encontro com estudo realizado na Alemanha onde os autores destacam a importância do monitoramento do mesmo pois os níveis de endotoxina presentes no dialisato eram mais elevados que na água tratada para diálise (BAMBAUER *et al.*, 1994).

No Brasil há programas de monitoramento de água para diálise em alguns estados como o de São Paulo e Rio de Janeiro, porém monitoram apenas a qualidade da água tratada para diálise (BUZZO *et al.* 2010; RAMIREZ, 2009). Por outro lado, trabalho realizado no Estado da Bahia, com a finalidade de propor um programa de monitoramento da qualidade da água tratada para diálise incluiu o monitoramento do dialisato apenas a nível de bactérias heterotróficas (COSTA, 2012). Apesar de importante, tal iniciativa deixa de abordar importante aspecto para a segurança do paciente.

As informações acima mencionadas obtidas empregando método convencional, permitem definir aspectos de risco ao paciente (FIGEL, 2011). Adicionalmente às sugestões mencionadas de elaboração e implementação de regulamentos mais rígidos, pode-se considerar o emprego de métodos que permitam resultados em menor tempo, com maior sensibilidade, dentre outras características promissoras, denominados alternativos.

Quando se compara os resultados obtidos deste trabalho no método alternativo com o método convencional pode-se perceber que todas as amostras que deram negativo no convencional também foram negativas no alternativo, porém uma das quatro amostras positivas no método convencional foi negativa no alternativo (Tabela 2.6). Paralelamente os dados desta tabela foram avaliados pelo Teste Exato de Fisher, o qual apresentou valor-P abaixo de 0,05 portanto há associação entre os métodos analisados.

Tabela 2.6- Comparação das médias positivas e negativas de cada método

Método	Método Alternativo			
	Positivo	Negativo	Total	
Convencional	Positivo	3	1	4
	Negativo	0	28	28
	Total	3	29	32

Em concordância com os dados do presente trabalho, Gee *et al.* (2008) analisando produtos de terapia celular tanto pelo método convencional quanto pelo PTS<sup>®</sup> observaram total concordância dos resultados negativos tanto no método convencional quanto no PTS<sup>®</sup>. Porém quando de resultados positivos no método convencional, independentemente da diluição da amostra, os resultados obtidos no PTS<sup>®</sup> mostraram-se inferiores, considerando-se os níveis de limites no ensaio qualitativo (convencional) e aqueles efetivamente quantificados (PTS<sup>®</sup>).

Este mesmo autor relata ainda, que tanto nos testes quantitativos quanto nos qualitativos deve-se considerar uma dupla margem de erro devido a natureza biológica da endotoxina presente na amostra e do reagente LAL, ocasionando que tais características intrínsecas ampliam a variabilidade decorrente de diferentes analistas, laboratórios, insumos utilizados e amostras, sendo portanto comum, para amostras positivas divergências nos resultados. A Food and Drug Administration (FDA) e a farmacopeia americana admitem esta limitação, o que reflete a faixa aceitável de recuperação em ensaios cinéticos ser de 50 a 200% (GEE *et al.*, 2008).

Pelo fabricante do PTS<sup>®</sup>, para que um teste seja considerado válido a porcentagem do coeficiente de variação do tempo de reação dos canais do cartucho onde a amostra é analisada deve ser menor que 25%, assim como o coeficiente dos canais que analisam o CPP (*spike*, com quantidade conhecida de endotoxina, 0,69 UE/mL, mais a amostra). Outro parâmetro a ser considerado é a porcentagem de recuperação do *spike* que deve ser de 50 a 200 % (CHARLES RIVER, 2019). Observou-se para a totalidade de ensaios efetuados no presente trabalho total aderência aos quesitos apresentados pelo fabricante do PTS<sup>®</sup>, conforme apresentado na Tabela 2.7. Pode-se portanto considerar que tanto os dados de validação quanto os de aplicabilidade estão de acordo com estes três parâmetros.

Tabela 2.7- Critérios de aceitação segundo o fabricante e os respectivos valores da validação e aplicabilidade

Critérios de aceitação	Dados de validação		Dados de aplicabilidade	
	Maior valor	Menor valor	Maior valor	Menor valor
<b>Coefficiente de variação dos canais de amostra</b>	0,0 %	10,5 %	0,0 %	21,6 %
<b>Coefficiente de variação dos canais do CPP</b>	0,0 %	14,3 %	0,0 %	18,3 %
<b>Recuperação do spike</b>	184 %	96 %	53%	175 %

Legenda: CPP- controle positivo do produto

De acordo com Williams (2001) apud Fukumori (2008, p. 57) a recuperação do *spike* dentro do critério de aceitação indica que a análise não está sofrendo interferência do produto. Isto sugere que a água tratada para diálise e o dialisato não interferiram nas análises para detecção de endotoxina. Apesar de fabricantes de reagentes do método de coagulação em gel ressaltarem que amostras com altas concentrações iônicas devem ser cuidadosamente analisadas, pois pode ocorrer agregação dos lipopolissacarídeos causando um falso negativo (PYROSTAR, 2015). Esta potencial interferência não se evidenciou no presente estudo.

BAMBAUER *et al.* (1994), diluíram amostras de dialisato, as quais possuíam bicarbonato em sua composição, a fim de evitar interferência causada por este componente em ensaios de LAL, os autores destacaram ainda que dialisatos compostos de diferentes tipos de concentrado polieletrólítico não influenciaram estatisticamente nos resultados do teste.

Em estudo que analisou a interferência salina em concentrados para hemodiálise em métodos de determinação de endotoxina que utilizaram o LAL, os autores concluíram que o método de coagulação em gel pode ser satisfatoriamente utilizado para análise de fluidos para hemodiálise. Este mesmo estudo relata ainda que o teste cromogênico compendial por ser mais demorado, teve seu uso limitado a situação exigindo diluições adicionais na amostra (BOHRER *et al.*, 2001). Pode-se dizer que, no presente trabalho o fato do PTS<sup>®</sup> realizar as análises em tempo reduzido de 15 minutos, foi possível contornar esta limitação do método cromogênico compendial, apesar da não diluição da amostra.

Pesquisa realizando a validação do PTS<sup>®</sup> considerou como critérios de aceitação o coeficiente de variação dos canais 1 e 3, coeficiente dos canais 2 e 4 e a porcentagem de recuperação do *spike*, concluindo que o PTS<sup>®</sup> pode ser utilizado em substituição ao método de coagulação em gel (FUKUMORI, 2008). Os demais parâmetros de validação descritos pelos compêndios oficiais e organizações internacionais não foram aplicados pelo autor (BRASIL, 2016; PDA, 2013; USP, 2017).

Estudo semelhante cuja validação considerou os mesmos três critérios, analisou amostras de produtos biofarmacêuticos e água para injetáveis, concluindo que para ambos grupos de amostras os resultados foram negativos tanto no PTS<sup>®</sup> quanto no método de coagulação em gel. Os autores destacam que o fato do PTS<sup>®</sup> ser um sistema miniaturizado reduz o volume de amostra usado no teste, minimiza a manipulação do analista e o risco de contaminação exógena. Ressaltam ainda que o PTS<sup>®</sup> forneceu resultados em 15 min, enquanto o método de coagulação em gel foi de 1 h. Nesta comparação os autores não fizeram destaque para o tempo de preparação das amostras e dos reagentes nem mesmo para o número e réplicas das amostras (JIMENEZ *et al.*, 2010).

No presente estudo foi possível observar que o tempo de preparação das amostras e reagentes no método convencional foi em torno de 45 min, enquanto que para o PTS<sup>®</sup> foi de 15 min. Pode-se ressaltar ainda que para o PTS<sup>®</sup>, neste período de tempo foram realizadas apenas a manipulação da amostra e do cartucho, assim como, a inserção de dados no aparelho, pois não houve a necessidade de preparação do reagente, o que justifica o menor tempo nesta etapa.

A duração da análise foi de 60 min no convencional e em média de 15 min no PTS<sup>®</sup>, tendo sido observado ainda que quanto maior o nível de endotoxina presente na amostra, menor o tempo de análise gasto pelo aparelho.

Durante a etapa de estudo de aplicabilidade foram analisadas 8 amostras em triplicata por dia, portanto o tempo total dispendido no método convencional foi de 115 min enquanto que no PTS<sup>®</sup> gastou-se 60 min por amostra, perfazendo um total de 480 min para analisar as 8 amostras em triplicata. Portanto em relação ao tempo de análise o PTS<sup>®</sup> mostrou-se rápido quando se trata de um monitoramento *in loco*, envolvendo a análise de poucas amostras. Já numa condição de rotina laboratorial com muitas amostras, o PTS<sup>®</sup> mostrou-se demasiadamente demorado (Tabela 2.8).

Tabela 2.8- Comparativo de tempo médio gasto para determinação de endotoxina em 8 amostras em triplicata

Etapa	Tempo (minutos)	
	Método Convencional	Método Alternativo
Preparo de amostra e materiais	55	15
		15
		15
		15
		15
		15
		15
		15
Análise	60	45
		45
		45
		45
		45
		45
		45
		45
<b>Total</b>	<b>115</b>	<b>480</b>

### 3.4 CONCLUSÃO

O monitoramento da qualidade da água tratada para diálise e dialisato é de fundamental importância para o tratamento de pacientes com doença renal com a qualidade e segurança necessárias. Para isso reveste-se portanto de elevado nível de importância que a legislação vigente deternime que seja efetuada a análise mensal de endotoxinas no dialisato da mesma forma como prevê a enumeração de bactérias heterotróficas.

Contudo os compêndios oficiais descrevem como teste de rotina métodos que demandam tempo elevado de análise e de elevado nível de manipulação por parte do analista. Os resultados do presente estudo demonstraram que o PTS<sup>®</sup>, por se tratar de método alternativo automatizado se mostrou adequado, em relação ao tempo de análise, quando se

tratando de análises *in loco*, permitindo análises em tempo real. Porém em se tratando de um laboratório cuja rotina envolve várias análises diárias mostrou-se mais demorado que o método convencional.

O trabalho de desenvolvimento dos diferentes parâmetros de validação mostrou que, exceto para a menor diluição analisada, todas apresentaram linearidade e precisão. Por outro lado a concentração de 0,25 UE/mL foi a menor que apresentou exatidão e especificidade. Observou-se ainda que o limite de detecção foi de 0,125 UE/mL e o de quantificação de 0,25 UE/mL, portanto o intervalo foi de 0,25 - 1,0 UE/mL. Adicionalmente pela análise de resistência pode-se perceber que ao variar analistas não houve diferença significativa.

Pode-se também concluir que, tendo em vista os resultados de validação e as concentrações escolhidas para estudo e em função do tipo de amostra que se objetivava analisar, o PTS<sup>®</sup> mostrou-se adequado para amostras que para as quais haja a expectativa de ausência de endotoxinas ou de concentração respeitando o intervalo de 0,25 UE/mL a 1,0 UE/mL.

### 3.5 REFERÊNCIAS

BAMBAUER, R.; SCHAUER, M.; JUNG, W. K.; DAUM, V.; VIENKEN, J. Contamination of Dialysis Water and Dialysate: A Survey of 30 Centers. **ASAIO J.**, Philadelphia, v. 40, n. 4, p. 1012-1016, 1994.

BOHRER, D.; HÖRNER, R.; NASCIMENTO, P. C.; ADAIME, M.; PEREIRA, M. E.; MARTINS, A. F.; HARTZ, S. A. Interference in the limulus amebocyte lysate assay for endotoxin determination in peritoneal dialysis fluids and concentrates for hemodialysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 26, n. 5-6, p. 811- 818, 2001.

BOMMER, J.; BECKER, K. P.; URBASCHEK, R. Potential Transfer of Endotoxin Across High-Flux Polysulfone Membranes. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v. 7, n. 6, p. 883-888, 1996.

BORGES, C. R. M.; LASCOWSKI, K. M. S.; FILHO, N. R.; PELAYO, J. S. Microbiological quality of water and dialysate in a haemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 103, p. 1791- 1797, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1.

BRASIL. **Primeiro Suplemento da Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016. 136 p.

BRASIL. Resolução RDC nº 11, de 13 março 2014. Dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 mar. 2014.

BRASIL. Resolução RDC nº 8, de 2 janeiro 2001. Aprova o Regulamento Técnico que Institui as Boas Práticas de Fabricação do Concentrado Polieletrólitos para Hemodiálise - CPHD. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 7 jan. 2001.

BURMEISTER, J. E.; CAMPOS, J. F.; MILTERSTEINER, D. R. Effect of different levels of glucose in the dialysate on the risk of hypoglycaemia during hemodialysis in diabetic

patients. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 323-327, 2012.

BUZZO, M. L.; BUGNO, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; KIRA, C. S.; CARVALHO, F. H.; SOUZA, A.; SCORSAFAVA, M. A. A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 1-6, 2010.

CHARLES RIVER. **Endosafe® nexgen-PTS™**. Disponível em: <https://www.criver.com/sites/default/files/resource-files/Endosafe-nexgen-PTS-Sheet.pdf>. Acesso em: 15 maio 2019.

CHARLES RIVER. **Endosafe®-PTS™**. Disponível em: [http://www.criver.com/files/pdfs/emd/endotoxin/qc\\_en\\_d\\_endosafe\\_pts\\_datasheet.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/emd/endotoxin/qc_en_d_endosafe_pts_datasheet.aspx). Acesso em: 4 de maio de 2017.

CONTADOR, J. L.; SENNE, E. L. F. Non-parametric tests for small samples of categorized variables: a study. **Gest. Prod.**, São Carlo, v. 23, n. 3, p. 588-599, 2016.

COSTA, J. S. C. **Proposta de monitoramento da qualidade da água utilizada no tratamento hemodialítico no estado da Bahia**. 2012. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

COULLIETTE, A. D.; ARDUINO, M. J. Hemodialysis and water quality. **Semin. Dial.**, Baltimore, v. 26, n. 4, p. 427-438, 2013.

DAUGIRDAS, J. T.; BLAKE, P. G.; ING, T. S. **Manual de diálise**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 658 p.

FIGEL, I. C. **Avaliação microbiológica em sistemas de água de diálise em clínicas especializadas de Curitiba, PR**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas – Microbiologia) – Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

FRESENIUS. **FX Classix**. Disponível em: <https://www.freseniusmedicalcare.com.br/pt-br/profissionais-de-saude/hemodialise/dialisadores/dialisadores-fx-classix/>. Acesso em: 18 maio 2019.

FUKUMORI, N. T. O. **Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em**

**radiofármacos pelo método de formação de gel. Validação.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações ) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GEE, A. P.; SUMSTAD, D.; STANSON, J.; WATSON, P.; PROCTOR, J.; KADIDLO, D.; KOCH, E; SPRAGUE, J.; WOOD, D.; STYERS, D.; MCKENNA, D.; GALLELLI, J.; GRIFFIN, D.; READ, E. J.; PARISH, B; LINDBLAD, R. A multicenter comparison study between the Endosafe<sup>®</sup> PTS<sup>®</sup> rapid-release testing system and traditional methods for detecting endotoxin in cell-therapy products. **Cytotherapy**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 427- 435, 2008.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTTENDAELE, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. **Food Microbiol.**, London, v. 27, n. 6, p. 710-730, 2010.

JIMENEZ, L.; RANA, N.; TRAVERS, K.; TOLOMANOSKA, V.; WALKER, K. Evaluation of the Endosafe<sup>®</sup> Portable Testing System<sup>™</sup> for the rapid analysis of biopharmaceutical samples. **PDA J. Pharm. Sci. Technol.**, Bethesda, v. 64, n. 3, p. 211-221, 2010.

KLEIN, E.; PASS, T.; HARDING, G. B.; WRIGHT, R.; MILLION, C. Microbial and Endotoxin Contamination in Water and Dialysate in the Central United States. **Artif Organs**, Cleveland, v. 14, n. 2, p. 85-94, 1990.

LEMGRUBER, A. P. M.; PRESGRAVE, O. A. F.; PRESGRAVE, R. F.; ALVES, E. N.; SILVA, R. S.; GIMENES, I.; FREITAS, J. C. B. R.; CALDEIRA, C. Effect of micropipette inaccuracy on performance of spectrophotometric assay for bacteria endotoxin dosage (chromogenic LAL) employed in products subjected to sanitary surveillance. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n.3, p. 368-72, 2011.

LIMA, J. R. O.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A. G.; SALGADO FILHO, N.; NUNES, P. C.; SILVA, H. S.; MONTEIRO, S. G.; COSTA, J. M. L. Microbiological analysis of water from hemodialysis services in São Luis, Maranhão, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 36, p. 103-108, 2005.

LONNEMANN, G.; SERENI, L.; LEMKE, H. D.; TETTA, C. Pyrogen retention by highly permeable synthetic membranes during in vitro dialysis. **Artif. Organs**, Cleveland, v. 25, n.

12, p. 951–960, 2001.

PARENTERAL DRUG ASSOCIATION. **Evaluation, validation and implementation of alternative and rapid microbiological methods**. Bethesda: Parenteral Drug Association, 2013. 53 p. (Technical Report, n. 33).

PARVEEN, S.; KAUR, S.; DAVID, S. A.W.; KENNEY, J. L.; MCCORMICK, W. M. M.; GUPTA, R. K. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products. **Vaccine**, Amsterdam, v. 29, n. 45, p. 8012-8023, 2011.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2015. 416 p.

PONTORIERO, G.; POZZONI, P.; ANDRULLI, S.; LOCATELLI, F. The quality of dialysis water. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Berlin, v. 18, suppl. 7, p. vii21–vii25, 2003.

PYROSTAR. **Interferentes en el ensayo de LAL**. North Chesterfield (VA): Fujifilm Wako Chemicals U.S.A., 2015. Disponível em: <https://www.wakopyrostar.com/blogs/post/interferentes-en-el-ensayo-de-lal/>. Acesso em: 16 maio 2019.

RAMIREZ, S. S. **Água para hemodiálise no estado do Rio de Janeiro**: uma avaliação dos dados gerados pelo programa de monitoramento da qualidade nos anos de 2006-2007. 2009. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Produtos Ambientais e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

RIELLA, M. C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1264 p.

ROMÃO, J. E. Crônica: definição, epidemiologia e classificação. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v. 26, n. 3, supl. 1, p. 1-3, 2004.

SANTOS-OLIVEIRA, R. Validação do PTS TM (Portable Test System) para Ensaio de Endotoxina em Radiofármacos (18-FDG). **Lat. Am. J. Pharm.**, La Plata, v. 28, n. 4, p. 633-637, 2009.

- SESSO, R. C.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; LUGON, J. R.; MARTINS, C. T. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2016. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 261-266, 2017.
- SILVA, A. M. M.; MARTINS, C. T. B.; FERRABOLI, R.; JORGETTI, V.; JUNIOR, J. E. R. Revisão/atualização em diálise: água para hemodiálise. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 180-188, 1996.
- SKARUPSKIENĖ, I.; BUMBLYTĖ, I. A.; TAMOŠAITIS, D.; VENTERIENĖ, J.; KUZMINSKIS, V. The level of endotoxins in hemodialysis water and dialysate in Lithuanian hemodialysis centers. **Medicina (Kaunas)**, v. 46, n. 8, p. 556- 560, 2010.
- SUZUKI, Y.; SUZUKI, K.; SHIMAMORI, T.; TSUCHIYA, M.; NIEHAUS, A.; LAKRITZ, J. Evaluation of a portable test system for assessing endotoxin activity in raw milk. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 78, n. 1, p. 49-53, 2016.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. 40. ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2017.
- VASCONCELOS, P. D. S. **Monitoramento da água de diálise**: um estudo de caso em uma clínica do município de Recife. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Gestão de Sistemas e Serviços de Saúde) - Departamento de Saúde Coletiva, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.
- WARD, R. A. Poor nutritional status and inflammation: ultrapure dialysate. **Semin. Dial.**, Baltimore, v. 17, n. 6, p. 489-497, 2004.

# *4 Capítulo III\**

**CITOMETRIA DE FLUXO: APLICAÇÕES NA QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA**

---

\* A informação contida neste capítulo está sendo formatada a fim de submissão no periódico Water Research (conceito Qualis 2016: A1 Farmácia).



## 4.1 INTRODUÇÃO

No campo da saúde há um esforço crescente em proporcionar assistência de qualidade ao paciente. Para isso é de fundamental importância que se garanta a qualidade dos produtos oferecidos, desde a seleção da matéria prima até a avaliação do produto acabado a fim de preservar a sua segurança (SUTTON; SINGER, 2011).

Neste contexto faz-se necessário um rigoroso controle de qualidade microbiológico utilizando metodologias que favoreçam obtenção de resultados de forma eficiente. Apesar dos métodos microbiológicos convencionais serem bem estabelecidos na rotina de análise laboratorial, menos dispendiosos e eficientes, possuem algumas limitações como: tempo de análise, seletividade do meio de cultura, condição física e requisitos nutricionais dos microrganismos (BRASIL, 2016; UNITED STATES PHARMACOPEIA – USP, 2017).

Devido a essas limitações foram desenvolvidos os métodos microbiológicos alternativos, que permitem a obtenção de resultados de forma rápida, precisa, reprodutível e que favoreçam uma ação corretiva em tempo real. Além de reduzir o tempo de análise, diminuem custos e proporcionam maior qualidade e segurança ao produto acabado, consequentemente, ao paciente. Dentre esses métodos podemos destacar a citometria de fluxo (PARVEEN *et al.*, 2011; INSTITUTE OF VALIDATION TECHNOLOGY, 2014; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A presente revisão bibliográfica tem como objetivo destacar as principais características da citometria de fluxo e determinar sua aplicabilidade na qualidade microbiológica da água.

## 4.2 BREVE HISTÓRICO

Em 1934 no Canadá foi descrito pela primeira vez um aparelho fotoelétrico ajustado ao microscópio óptico a fim de registrar células que passavam forçadamente por um tubo capilar (MOLDAVAN, 1934).

Durante a Primeira Guerra Mundial iniciou-se o uso de microrganismos, e produtos derivados dos mesmos, como arma biológica a fim de provocar lesões, enfermidades e mortes. Nos anos 40, período da Segunda Guerra Mundial, houve um aumento de estudos relacionados a esse tipo de arma. Enquanto isto o exército dos EUA se preocupava no desenvolvimento de um aparelho que pudesse detectar de forma rápida aerossóis de agentes

bacterianos usados como armas biológicas. (GUCKER *et al.*, 1947; TUTUNJI, 2003).

Em 1945 foi desenvolvido pela primeira vez um aparelho, hoje conhecido como citômetro de fluxo, que realizava uma contagem por minuto de uma corrente de ar que continha partículas de dioctilftalato. Desde então, Gucker *et al.* (1947), visualizaram o potencial de emprego desta tecnologia para aplicação na biologia, bacteriologia e indústria.

Na década de 50 foi descrita a conjugação de anticorpos ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (COONS; KAPLAN,1950). Ainda nesta década a citometria de fluxo foi adotada para contagem de células sanguíneas (MATTERN; BRACKETT; OLSON; 1957).

No ano de 1969, foi desenvolvido um sistema de detecção quantitativa de células coradas com fluorocromo, este sistema possuía como fonte de luz íons de argônio (VAN DILLA *et al.*, 1969). A fim de aprimorar análises quantitativas e qualitativas no final da década de 60 a medição da dispersão de fluorescência foi incorporada (SHAPIRO, 2004).

Com isso, em 1975 a Coulter Electronics, hoje Beckman Coulter, lançou no mercado um citômetro de fluxo de fluorescência, o qual possuía como fonte de laser íons de argônio, possibilitando medir a dispersão e fluorescência emitidas (SHAPIRO, 2004).

Em 1973 foi desenvolvido um analisador e classificador de células com a tecnologia da citometria de fluxo, no ano seguinte Hemalog D (Technicon), um contador diferencial comercial, foi utilizado a fim de realizar a classificação de células brancas (HULETT *et al.*, 1973; MANSBERG; SAUNDERS; GRONER, 1974).

Apenas na Conferência da American Engineering Foundation, que ocorreu na Flórida no ano de 1978, o termo citometria de fluxo foi usado para renomear a técnica previamente chamada de citofotometria de pulso (BRITISH SOCIETY FOR IMMUNOLOGY'S, 2018).

Devido ao fato de alguns corantes não serem excitados no comprimento de onda do laser de argônio, experimentos a fim de se obter um equipamento que possuísse combinação de laser começaram a ser realizados. Assim, em 1979 a Becton-Dickinson comercializou o primeiro citômetro de fluxo com laser duplo, chamado de FACS IV, o qual combinava laser de criptônio (568 nm) e argônio (488 nm) (STEINKAMP; ORLICKY; CRISSMAN, 1979).

A fim de diminuir ainda mais o tempo das análises, na década de 1980 foi desenvolvido um citômetro de fluxo de alta velocidade com laser duplo pelo Laboratório Nacional Lawrence Livermore. Este equipamento tinha como intuito classificar células dez a vinte vezes mais rapidamente do que os equipamentos existentes na época (PETERS *et al.* 1985).

No ano de 1982 estudo demonstrou a aplicabilidade da citometria de fluxo na microbiologia, para isso utilizou-se um citômetro de fluxo baseado em um microscópio de

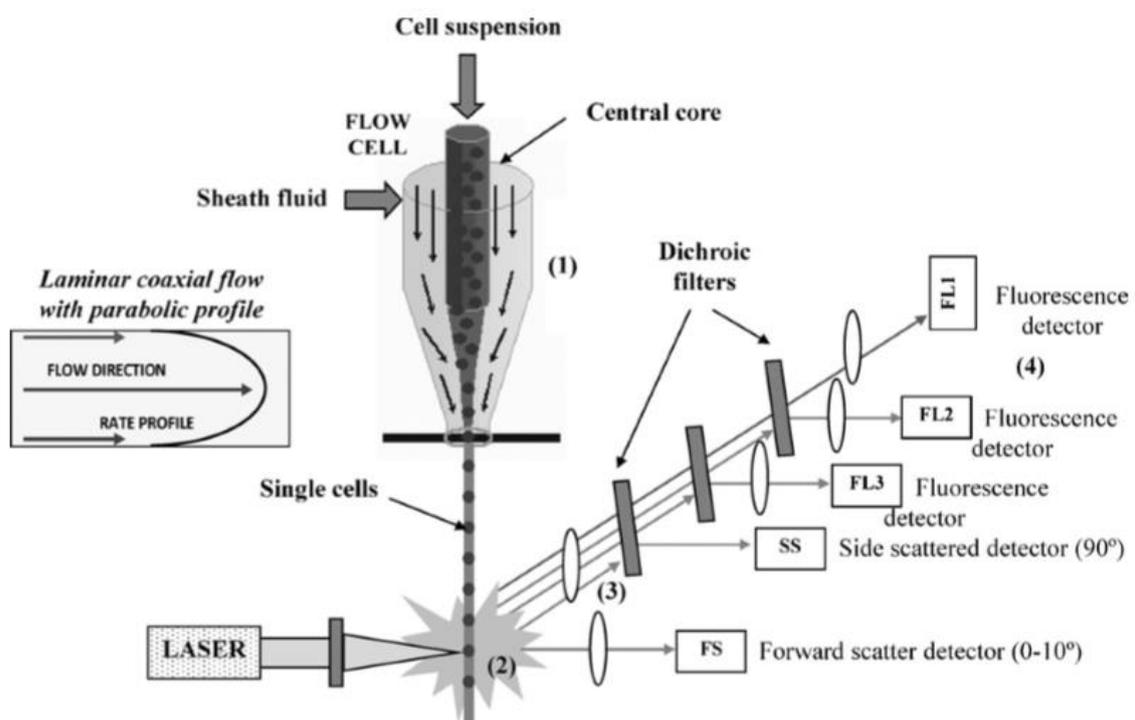
fluorescência padrão e substituíram a lâmpada de arco de mercúrio por um laser de argônio. As análises objetivaram estudar a cinética do ciclo celular de *E. coli* e como alguns antibióticos afetavam essa cinética. Os autores concluíram que a citometria de fluxo é capaz de medir células ao nível individual de forma precisa e rápida (STEEN *et al.*, 1982).

No ano seguinte Van Dilla e colaboradores (1983) analisaram urina de pacientes com infecção de trato urinário com um citômetro de fluxo de duplo feixe. Para as análises utilizaram dois corantes fluorescentes de DNA (cromomicina A3 e Hoechst 33258). Concluíram que o método utilizado poderia ser empregado para análises de bactérias não só em amostras clínicas mas também ambientais e de alimentos (VAN DILLA *et al.*, 1983).

### 4.3 PRINCÍPIOS DA CITOMETRIA DE FLUXO

Essa técnica permite a obtenção de resultado em um curto período de tempo, aproximadamente 1h, fator importante para a tomada de decisão durante o processo produtivo de um produto. É uma técnica quantitativa por meio da qual as células passam por um feixe de luz que as caracteriza em nível de célula única (DÍAZ *et al.*, 2010; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). A Figura 3.1 ilustra um esquema do funcionamento de um citômetro de fluxo.

Figura 3.1- Esquema do funcionamento de um citômetro de fluxo



Resumidamente, o sistema de fluido hidráulico produz a focalização hidrodinâmica a fim de fazer as células passarem em fila única pela fonte de luz, a qual pode ser tanto raio laser (mais usual) quanto lâmpada de arco (Hg ou Xe, por exemplo). São desta forma produzidos sinais os quais estão relacionados aos parâmetros intrínsecos das células, pois são obtidos sem a necessidade de corantes (DÍAZ *et al.*, 2010; PICOT *et al.*, 2012).

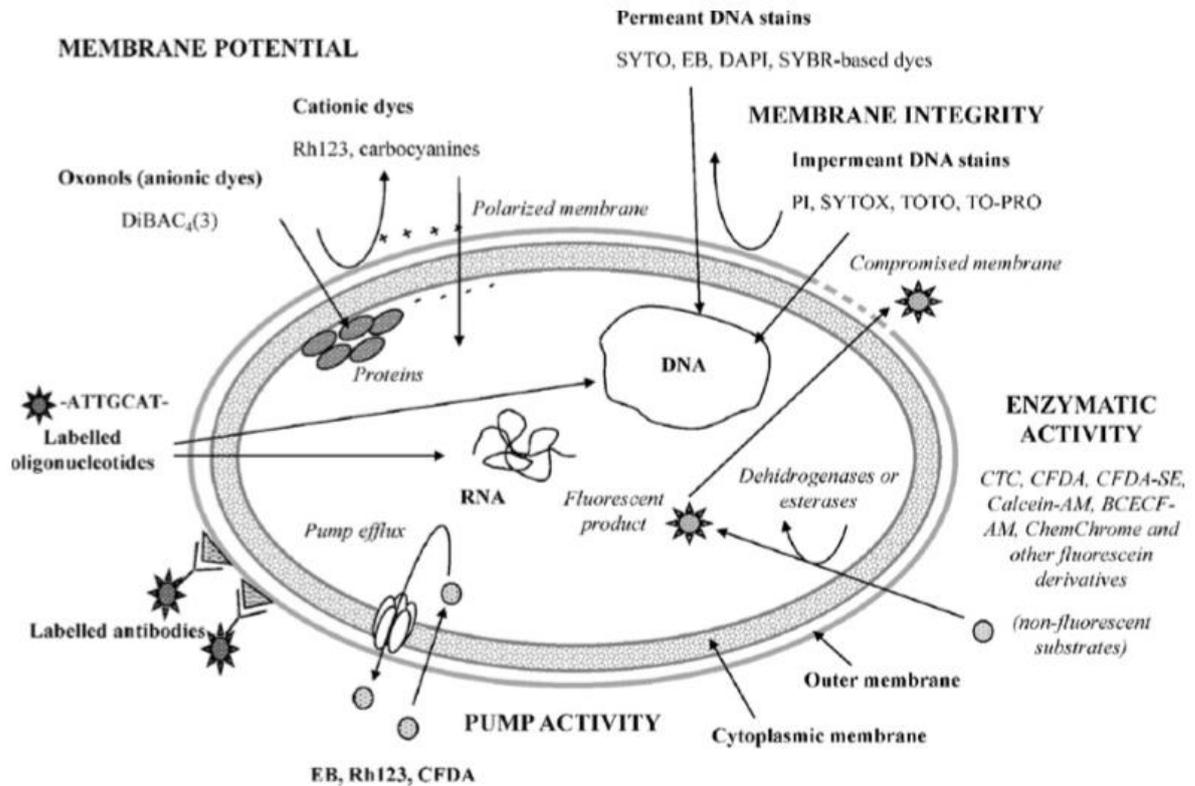
O tamanho da célula é medido pela luz espalhada coletada na mesma direção da luz incidente, chamado de *Forward Angle Light Scatter* (FALS) ou *Forward Scatter* (FS). Quanto mais luz espalhada maior é o tamanho da célula, ao passo que a complexidade da célula é proporcional à fração de luz espalhada no ângulo direito chamado de *Right Angle Light Scatter* (RALS) ou *Side Scatter* (SS). Caso as amostras sejam coradas com fluorocromo é possível que se obtenham informações adicionais (GIVAN, 2001; DÍAZ *et al.*, 2010).

O sistema óptico é formado por vários filtros ou espelhos dicróicos, que absorvem em determinados comprimentos de onda. Os detectores são fotodiodos ou tubos fotomultiplicadores que medem a extensão da fluorescência ou da luz dispersa, em seguida o sistema eletrônico faz a conversão de sinais ópticos em sinais eletrônicos, os quais são analisados por um software (GIVAN, 2001; DÍAZ *et al.*, 2010; PICOT *et al.*, 2012).

Os fluorocromos fornecem informações adicionais sobre a estrutura ou funcionalidade das células. A diferenciação celular quanto à viabilidade é possível tendo em vista propriedades estruturais ou funcionais, como atividade metabólica, potencial de membrana e sua integridade (PORTER; EDWARDS; PICKUP, 1995; DÍAZ *et al.*, 2010).

Medições de atividade enzimática indicam atividade metabólica, sendo a medição de atividade da esterase a mais comum. Logo após o substrato não fluorescente entrar na célula, sofre ação das enzimas intracelulares e resulta em um produto fluorescente, o qual é retido em células com membrana intacta. Quanto ao potencial de membrana, apenas células vivas são capazes de mantê-lo, sua medição é possível com o uso de corantes lipofílicos, que ao atravessarem a membrana celular se acumulam conforme sua carga. A integridade da membrana consiste na análise mais definitiva da viabilidade celular, pois uma célula íntegra, além de gerar potencial de membrana, mostra a atividade metabólica da célula (Figura 3.2) (DÍAZ *et al.*, 2010).

Figura 3.2- Esquema de diferentes locais-alvo celulares de fluorocromos



FONTE: DÍAZ *et al.*, 2010.

Os fluorocromos devem ser biologicamente inertes, possuir alta intensidade de fluorescência, espectro de emissão estreito (para evitar sobreposição), fotoestabilidade, baixa toxicidade e solubilidade em água (DÍAZ *et al.*, 2010).

#### 4.4 APLICABILIDADE DA CITOMETRIA DE FLUXO NA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

A água é um recurso natural amplamente utilizado, pois além de ser indispensável à sobrevivência humana ainda influencia diretamente sobre a saúde e qualidade de vida, portanto a falta de qualidade da água pode colocar em risco a vida de pessoas (PARÁ, 2011).

Em formulações farmacêuticas a água é a matéria prima empregada em maior volume, e caso esteja fora dos parâmetros de qualidade pode impactar negativamente o produto, pois mesmo possuindo pequeno nível de nutrientes está sujeita a contaminação microbiana (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A contaminação microbiológica pode ser causada por bactérias e seus produtos de degradação como as endotoxinas (SILVA *et al.*, 1996). Ocasionalmente protozoários, vírus e fungos também podem ser encontrados como contaminantes (PONTORIERO *et al.*, 2003).

No ambiente aquático as bactérias podem ser encontradas nas formas planctônica e bêntica. A forma planctônica é formada por células livres e dispersas em meio líquido, possuem a capacidade de se multiplicam de maneira rápida. Esta forma pode ser originada da forma bêntica (SPOERING; LEWIS, 2001; ROSSI; PORTO, 2009).

A forma bêntica são agregados de bactérias, e até mesmo fungos, em camadas ligadas por exopolissacarídeos (EPS), produzidos por bactéria, o mesmo é responsável pela adesão a superfícies. Esses aglomerados, também chamados de biofilmes, funcionam como uma barreira de proteção contra os antimicrobianos (ROSSI; PORTO, 2009; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Devido à baixa disponibilidade de nutrientes as células em estados intermediários podem estar presentes na microbiota aquática, os quais não são detectáveis por métodos clássicos de cultivo em meio de cultura (CUNDELL, 2004; DÍAZ *et al.*, 2010; SANDLE, 2014).

As divergências entre resultados obtidos nos experimentos laboratoriais e a real contaminação microbiana do sistema natural da água são conhecidas. Decorrem em grande parte da presença de microrganismos viáveis-não-cultiváveis (VNC) incapazes de se dividir e formar colônias, ainda que possuindo mecanismo metabólico ativo e permanecendo vivas. Muitas bactérias, especialmente as gram-negativas, apresentam esta capacidade. Pode-se destacar as espécies de *Mycobacterium* como potenciais VNC (JOUX; LEBARON, 2000; DÍAZ *et al.*, 2010; SANDLE, 2015).

A citometria de fluxo detecta esses microrganismos, permitindo obter maiores níveis de contagem quando comparada com a metodologia convencional (SANDLE, 2015). No Quadro 3.1 estão resumidamente descritos artigos que aplicaram a citometria de fluxo na análise da água.

Quadro 3.1- Descrição de artigos que aplicaram a citometria de fluxo na análise de água desde 1992

Artigo	Metodologia	Corante utilizado	Resultados	Conclusão
<b>MONFORT; BALEUX, 1992</b>	A fim de validar a contagem total de bactérias por citometria de fluxo (com <i>beads</i> de diâmetro de 1.97 µm como padrão interno) a mesma foi comparada com a contagem obtida por observação direta através da microscopia por epifluorescência. Para isso utilizou-se cepa de <i>E. coli</i> , amostra de água do Lago Maggiore (Itália) e 18 amostras de água salobra do rio <i>St. Lawrence Estuary</i> (Canadá), as quais foram coletadas na extensão do gradiente de concentração de água doce para água marinha. Todas as amostras foram fixadas com formalina, diluídas e coradas, sendo que uma parte de cada amostra foi filtrada para análise por microscopia de epifluorescência, e a outra parte foi analisada por citometria de fluxo. Por fim, foram feitas análises estatísticas.	4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI)	No citograma da análise de <i>E. coli</i> pode-se observar que a cepa ficou bem separada das <i>beads</i> tanto por FALS quanto por fluorescência, porém a mesma não foi satisfatória para a calibração de tamanho devido à característica de espalhamento das <i>beads</i> . Quanto as amostras de água do <i>St. Lawrence Estuary</i> obteve-se uma sequência de células com fraca dispersão de luz contendo pouco DNA e células com dispersão maior de luz com mais DNA, o que indica que células com FALS baixo possuem volume menor que células com FALS alto, o que confirma a correlação entre FALS e volume de bactérias. Ao comparar estatisticamente os resultados de citometria de fluxo e microscopia de epifluorescência pôde-se observar que não foram significativamente diferentes. As ultramicrobactérias são difíceis de distinguir tanto com microscopia de epifluorescência quanto por citometria de fluxo, portanto nem todas puderam ser detectadas. Isso sugere perdas em sinais de fundo.	A citometria se mostrou confiável não só para análise de bactérias de referência, mas também para amostras de água natural. Adicionalmente mostra-se uma técnica que permite a rápida quantificação de bactérias.

Artigo	Metodologia	Corante utilizado	Resultados	Conclusão
<p><b>CATALA et al., 1999</b></p>	<p>Neste estudo utilizou-se cepas recomendadas pelas farmacopeias americanas e europeias e as comumente encontradas em água marinha. As amostras eram provenientes de diferentes fontes: torneira do laboratório; água desmineralizadas e purificadas do <i>Rhone-Poulenc</i> (Paris), água mineral de 1 L comercialmente engarrafada, mar Mediterrâneo perto de <i>Banyuls-sur-Mer</i> (coletadas em diferentes profundidades e períodos) e no porto de <i>Banyuls-sur-Mer</i>. Após diluídas as amostras foram inoculadas em Reasoner's 2A agar (ágar R2A) ou ágar Marine a 25°C e incubadas por duas semanas. A fim de determinar a contagem total as amostras foram coradas (corante 1), incubadas por 30 mim em temperatura ambiente no escuro, e analisadas por citometria de fluxo.</p> <p>Adicionalmente as amostras foram esterilizadas por filtração e tratadas com corante 2, incubadas por 5 min a temperatura ambiente no escuro e analisadas por citometria de fluxo. A fim</p>	<p>Corante 1: SYBR-II</p> <p>Corante 2: CSE</p> <p>Corante 3: ChemChrome V6</p> <p>Combinação de corantes: ChemChrome V6 e CSE</p>	<p>Nas cepas que receberam tratamento térmico e coradas com CSE observou-se fluorescência brilhante, enquanto que as células que não receberam tratamento térmico e foram coradas com CSE não apresentaram intensidade de fluorescência detectável. Houve, portanto, boa discriminação entre células vivas e mortas, mesmo com as intensidades variando entre as diferentes cepas testadas. Ao ser testado o efeito do CSE na viabilidade das células pôde-se observar que o mesmo pode ser usado em combinação com outro corante, pois não afetou o crescimento das células vivas. Quanto às análises das amostras de águas naturais, a contagem de células ativas utilizando o corante ChemChrome V6 combinado ou não com CSE foi maior ou igual a contagem pelo método de cultivo, sendo que as maiores contagens foram observadas nas amostras provenientes da água do mar, o que sugere a presença de células ativas mas não cultiváveis. Quando os corantes foram combinados, geralmente a contagem de células ativas foi menor</p>	<p>O corante CSE deve ser utilizado como contra-corante de corantes de células viáveis.</p>

	<p>de determinar células ativas utilizou-se uma combinação de corantes e fez-se a análise no citômetro de fase sólida ChemScan (Chemunex). Realizou-se ainda contagem de células ativas por meio da determinação da síntese metabólica (resumidamente este método se baseia na inibição da divisão celular por uma mistura de antibióticos seguida de adição de nutrientes, incubação, fixação e coloração com o corante 1 e análise por citometria de fluxo) e pela respiração de células individuais (por meio da redução do cloreto de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazólio (CTC)). Adicionalmente utilizou-se o citômetro de varredura laser a fim de quantificar células viáveis, sendo que no canal verde (500-530 nm) foi coletado a emissão do corante 3 e no canal vermelho (560-585 nm) do corante 2. Adicionalmente algumas cepas foram analisadas com e sem tratamento térmico, a fim de determinar a sensibilidade do corante 2 em identificar células sem integridade de membrana (mortas).</p>		<p>nos diferentes tipos de água, pois células coradas com ambos não foram contadas como célula ativa. Na análise por contagem direta de viáveis (DVC) obteve-se resultado congruente com o de combinação de corantes, que não foi observado para a contagem de células respiratórias, as quais apresentaram contagens inferiores a combinação de corantes e DVC.</p>	
--	---	--	--	--

Artigo	Metodologia	Corante utilizado	Resultados	Conclusão
<p><b>GRÉGORI <i>et al.</i>, 2001</b></p>	<p>Amostras de água doce foram coletadas de três rios da Itália (rios Adda, Lambro, e Seveso). Adicionalmente realizou-se o monitoramento das águas do rio Adda, por meio de coletas em três locais diferentes tendo como ponto de referência uma saída de esgoto (1km a montante, 1 e 6 km a jusante). Paralelamente amostras de água superficial do mar foram coletadas na França (no porto Pointe-Rouge e na frente da Ilha de Maire).</p> <p>Para as análises foram utilizados três citômetros de fluxo: um equipado com lâmpada de xenônio de 75 W, e filtro de excitação de 470 a 490 nm utilizado para amostras de água doce, outro equipado com laser de argônio refrigerado a ar (comprimento de onda de excitação a 488 nm) para as amostras de água do mar, e o terceiro equipado com laser de argônio de 488 nm para classificação celular. Para a coloração dupla de ácidos nucleicos foram utilizadas sondas fluorescentes. As células que foram</p>	<p>Sondas fluorescentes: SYBR Green I ou II e Iodeto de propídio (PI)</p> <p>Esquema 1: SYBR Green I e PI;</p> <p>Esquema 2: SYBR Green II e PI</p> <p>Corante para determinação da atividade de esterase: 5-diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e 6-CFDA</p>	<p>Poucas células oriundas de amostras de água marinha foram coradas quando se utilizou o corante PI, enquanto que quando coradas com SYBR Green II pode-se distinguir duas populações de células. Ao serem submetidas a tratamento térmico, amostras de água marinha coradas com PI evidenciou bactérias com membrana comprometida, enquanto que as coradas com SYBR Green II apresentaram citograma semelhante às anteriormente coradas com SYBR Green II (sem tratamento térmico). Ao incubar simultaneamente as amostras tratadas com calor, tanto as coradas com PI quanto com SYBR Green II exibiram fluorescência vermelha. Quando uma amostra de água do mar foi corada duplamente com PI e SYBR Green II as células que se coraram em verde ao serem separadas e coradas com CFDA, resultaram em um aumento significativo na fluorescência verde, por outro lado, células tratadas termicamente e duplamente coradas</p>	<p>O fato das células permanecerem coradas em verde após a dupla coloração permite classificá-las como viáveis. Pode-se destacar que tanto após o tratamento com calor quanto com ozônio, células com membranas comprometidas coraram em vermelho, o que qualificou o protocolo de <i>nucleic acid double-staining</i> (NADS) como ensaio de integridade de membrana para bactérias provenientes de ambientes aquáticos (água doce ou marinha). Por se tratar de coloração para determinação de integridade de membrana, fornece</p>

	<p>coradas em verde foram submetidas a nova coloração a fim de detectar a atividade de esterase em células vivas. Amostras de água doce foram coradas com o esquema 1 de coloração em três diluições diferentes e as de água do mar com o esquema 2. Adicionalmente foi determinado a cultivabilidade das bactérias de água doce por inoculação em <i>Plate Count Agar</i> (agar PCA). Um litro de água doce foi submetido ao tratamento com ozônio e em seguida foi analisada por citometria de fluxo e plaqueamento em PCA para verificar a viabilidade e a cultivabilidade bacteriana respectivamente. Adicionalmente realizou-se a caracterização por citometria de fluxo de bactérias com membrana comprometida após tratamento térmico de uma amostra de água do mar. A fim de interpretar os resultados considerou-se: Fluorescência verde corresponde a células vivas, verde mais laranja-vermelho a células danificadas e vermelho-alaranjado a mortas.</p>		<p>produziram apenas fluorescência vermelha e após serem coradas com CFDA não emitiram fluorescência verde. Amostras de água doce duplamente coradas apresentaram coloração verde, e após passarem pelo tratamento com ozônio apresentaram coloração vermelha. Não houve crescimento de colônias no método convencional após o tratamento com ozônio. A diluição considerada ideal para coloração com SYBR Green I foi a de 1:100.000 em amostras com até <math>0,5 \times 10^6</math> bactéria por <math>\text{cm}^{-3}</math> com <math>10 \mu\text{g cm}^{-3}</math> de PI. Por outro lado nas amostras com mais que <math>20 \times 10^6</math> bactéria por <math>\text{cm}^{-3}</math> a diluição ideal de SYBR Green I foi de 1:10.000 e <math>10 \mu\text{g cm}^{-3}</math> de PI. Quanto ao monitoramento do rio Adda a 1 km a montante 61 % do total de bactérias foram coradas em verde e verde-mais-vermelho, e 39% coraram em vermelho. No local do fluxo de esgoto há uma intensa entrada bacteriana (<math>5 \times 10^7</math> células <math>\text{cm}^{-3}</math>), a qual a 1km a jusante reduziu em 80 %, e 90% a 5 km mais a jusante.</p>	<p>dados de bactérias viáveis (ativas, inativas, cultiváveis e não cultiváveis) com membranas danificadas e membranas comprometidas, porém são necessárias abordagens adicionais para demonstrar a presença de atividade ou metabolismo e capacidade de divisão. NADS associado a citometria de fluxo trará não só melhorias quantitativas mas também qualitativas para a caracterização do papel das bactérias no ambiente aquático.</p>
--	--	--	---	---

			<p>Também observou-se que no escoamento de esgoto 60% das células coraram em vermelho, sendo que a 1 km a jusante esse valor foi reduzido pela metade e ficou ausente a 6 Km, enquanto que a montante a percentagem de coradas em vermelho foi de 35%. Quanto às amostras coletadas no porto de Pointe-Rouge, observou-se 80% mais bactérias do que no local em frente da Maire Island. Pointe-Rouge apresentou ainda 53% das células coradas em vermelho, 41% em verde e 6% em verde mais-vermelha, enquanto que em Maire Island apresentou 33% vermelhas, 62% verdes e 5% verde mais-vermelhas. Das amostras coletadas em frente a Maire Island pode-se distinguir duas populações diferentes de bactérias coradas em verde (baixo e alto conteúdo de DNA), sendo que após a coloração dupla as de alto conteúdo permaneceram verdes, enquanto que as de baixo conteúdo 68% permaneceram verdes, 2% coraram em verde-mais-vermelho e 30% coraram-se em vermelho.</p>	
--	--	--	--	--

Artigo	Metodologia	Corante utilizado	Resultados	Conclusão
<b>KAWAI <i>et al.</i>, 2002</b>	Amostras de água foram submetidas a filtração por membrana, e esta transferida para o meio de cultura (agar digestão caseína de soja e R2A). Foi feito a amplificação de DNA tanto do filtrado quanto da extração das colônias dos meios onde o filtrado foi previamente inoculado. Em seguida realizou-se eletroforese em gel de gradiente desnaturante. Para a atividade fisiológica de bactérias dominantes foi feito uma triagem celular seguida de análise por citometria de fluxo.	6-CFDA	Houve diferença no número e espécies entre os meios de cultura utilizados, sendo que o R2A apresentou maior número de colônias. O corante utilizado permitiu a classificação de bactérias dominantes com atividade de esterase, o que não ocorreu em ambos meios de cultura utilizados.	As bactérias dominantes presentes na amostra são VNC evidenciando a importância dos métodos microbiológicos que independem do cultivo para um correto monitoramento de sistema de águas.
<b>PIANETTI <i>et al.</i>, 2005</b>	Foram coletados diferentes tipos de água (salobra, do rio, de nascente, mineral e potável com cloro). Em seguida três litros de cada tipo de água foram filtrados em uma membrana de 0,22 µm a fim de reter bactérias autóctones. Antes da inoculação as cepas de <i>Aeromonas hydrophila</i> , isolada de água de irrigação, passou por diversas etapas para regeneração. Posteriormente tal cepa foi adicionada a 800 mL de cada tipo de água e objetivando uma concentração de $5 \times 10^6$ CFU/ml, foram incubadas a 18 °C - 25 °C, tendo sido a análise realizada em triplicata. As amostras foram analisadas diariamente, durante 30 dias por análise turbidimétrica e contagem em placa.	PI e SYBR Green I.	Na análise turbidimétrica pôde-se observar que a água salobra apresentou pequeno aumento na densidade óptica (0,07 a 0,095) nas primeiras 24 h, a qual reduziu gradualmente nos últimos quatro dias até 0,022. Nas amostras de água mineral observou-se diminuição gradual até 0,005 no último dia. Para os outros tipos de água observou-se diminuição nos primeiros seis a dez dias (de 0,07 a 0,008 a 0,009), sendo que para água do rio chegou a 0 no dia 27 e para água de nascente e água potável no dia 29. Observou-se correlação entre a absorbância e contagem em placas ( $P < 0,001$ ; $R^2 < 0,096$ para água do rio; $R^2 < 0,097$ para água salobra; $R^2 < 0,099$ para os outros tipos de água; $R^2 < 0,098$	A citometria de fluxo é uma ferramenta válida, pois por meio da avaliação da viabilidade bacteriana é possível uma melhor caracterização da microbiologia da água, permitindo a prevenção de riscos à saúde.

	<p>Neste último método 1 mL de amostra foi inoculado em ágar Havelaar (Biolife) (triplicata) e as placas incubadas a 28° C por pelo menos 24 horas. Paralelamente realizou-se a análise em um citômetro de fluxo, provido de laser de argônio. Utilizou-se uma combinação de corantes a fim de avaliar a integridade de membrana. As células foram analisadas por dois parâmetros de fluorescência: emissão de fluorescência verde e emissão de fluorescência laranja-vermelho. Células com membrana íntegra, ou seja, vivas ficaram coradas em verde enquanto que células com membrana danificadas coraram em verde e laranja-vermelho e por fim células com membranas comprometidas, mortas, coraram em laranja-vermelho. Adicionalmente parâmetros físico-químicos foram analisados antes da inoculação, são eles: condutividade a 20 ° C, dureza total, alcalinidade total, pH, concentrações de cloro, sulfatos, fosfatos, nitratos, amônia, cálcio, ferro, prata, cobre, magnésio e carbono orgânico total (TOC). A fim de detectar alguma alteração após o crescimento bacteriano algumas análises físico-químicas (nitratos, amônia, fosfatos, sulfatos e TOC e pH) foram repetidas ao final do experimento.</p>		<p>para a cultura controle). Quanto a análise por citometria de fluxo observou-se que a água potável apresentou maior porcentagem de células viáveis (47 a 74% ao longo do experimento) enquanto que a água mineral apresentou os menores valores (10% a partir do dia 12), os outros tipos de água apresentaram valores em torno de 50% no último dia. A água mineral apresentou mais células danificadas (9 a 30% durante o experimento). No dia 23 a água potável apresentou células vivas, (74%) na análise por citometria de fluxo, porém não houve contagem em placa. Quanto às análises físico-químicas a água salobra apresentou os maiores valores na análise que antecedeu a inoculação, são elas: condutividade elétrica, dureza total, concentrações de cloro, sulfatos, cálcio, magnésio e TOC; na análise final as concentrações de nitrato foram menores em todos os tipos de água, enquanto que as concentrações de amônia, fosfatos, sulfatos e TOC foram maiores.</p>
--	--	--	---

Artigo	Metodologia	Corante utilizado	Resultados	Conclusão
<b>BERNEY <i>et al.</i>, 2008</b>	Foram analisadas amostras de água provenientes de diferentes fontes: torneira doméstica, não clorada; de nascente natural, não tratada; e comercialmente engarrafada. Cada amostra foi dividida em quatro sub-amostras e coradas com três tipos de corantes simples e uma combinação de corantes. Como controle de bactérias inativas uma alíquota de cada amostra foi incubada a 90 ° C durante 3 min (a fim de diferenciar o padrão de coloração). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo e por metodologia convencional em agar PCA e R2A. Adicionalmente determinou-se o ATP total.	Combinação: SYBR Green I and PI.  Corantes simples: SYBR Green, Ácido (bis-1,3-dibutilbarbitúrico) trimetina oxonol (DiBAC4(3)) e CFDA	Todas as células, independentemente do estado fisiológico foram coradas com SYBR Green I. Na maioria das amostras coradas com SYBR Green associado ou não com PI mostrou dois aglomerados os quais correspondem a bactérias de alto teor de ácido nucleico (HNA) e bactérias de baixo teor de ácido nucleico (LNA), sendo que as primeiras não foram alteradas pelo tratamento térmico. Quando se utilizou o corante DiBAC4(3) foi possível observar células com atividade de esterase. A correlação entre ATP e citometria de fluxo foi satisfatória. A água potável engarrafada apresentou maior porcentagem de células viáveis em todos os indicadores. Os métodos convencionais apresentaram correlação muito fraca com a citometria de fluxo, pois detectaram não mais de 1% da concentração celular total nas amostras analisadas, exceto na água engarrafada a qual apresentou até 15% de células cultiváveis. As concentrações totais de ATP e as celulares totais não apresentaram correlação significativa. As melhores correlações foram observadas entre contagens com CFDA e as concentrações totais de ATP, HNA e concentrações totais de ATP e entre contagens de células intactas e polarizadas.	O uso de SYBR Green I, PI, DiBAC4 (3) e CFDA deve ser incentivado, como corantes na citometria de fluxo combinado com o ATP total a fim de monitorar a qualidade da água potável e estudar sistemas de tratamento e distribuição de água. Sugere-se ainda uma revisão nos parâmetros da legislação vigente tendo em vista a diferença de resultado entre o método convencional e alternativo.

Artigo	Metodologia	Corante utilizado	Resultados	Conclusão
<p><b>HAMMES <i>et al.</i>, 2008</b></p>	<p>Foi coletada água superficial de uma estação piloto de tratamento de água no Lago de Zurique na Suíça, a qual possuía as seguintes etapas de tratamento: reator de ozonização, filtração de carbono ativo granular e filtração por membrana. As amostras foram coletadas 3 vezes por semana durante 3 semanas antes e depois de cada etapa de tratamento, sendo que no reator de carbono granular houve, coleta em quatro níveis diferentes. As amostras foram coradas e incubadas no escuro por 15 minutos e analisadas por um citômetro de fluxo. A fim de confirmar a natureza bacteriana das partículas coradas, amostras selecionadas foram analisadas por microscopia de epifluorescência. Paralelamente foi realizado o método convencional, conforme diretrizes suíças, com <i>plate count agar</i>. Adicionalmente foi determinado o ATP total.</p>	<p>SYBRs Green I</p>	<p>Após o processo de ozonização houve significativa redução da contagem bacteriana, mas após a filtração por carbono ativo granular observou-se aumento de bactérias planctônicas nos diferentes níveis do filtro. Os níveis mais baixos de coleta apresentaram maior crescimento, evidenciado em dois aglomerados: bactérias de alto teor de nucleico e bactérias de baixo teor de ácido nucleico. Enquanto que no nível superior apenas um aglomerado foi visualizado. Na última etapa, a de filtração por membrana, as concentrações bacterianas ficaram abaixo do limite de detecção do aparelho (<math>200 \text{ células mL}^{-1}</math>), evidenciando uma filtração bem-sucedida. Ao comparar o método convencional com a citometria de fluxo percebe-se que, com exceção da água bruta, a contagem observada foi semelhante, porém o tempo de análise foi 3-7 dias, enquanto que para a citometria de fluxo foi de 20min. Na análise de ATP não foram observados os mesmos padrões citados acima, principalmente após a ozonização e no nível mais elevado da filtração de carbono ativo granular.</p>	<p>A citometria de fluxo mostrou vantagens sobre as outras técnicas. Quando a mesma é comprada ao método tradicional o tempo de análise foi significativamente mais rápido, permitindo que ações sejam tomadas o mais rapidamente. A citometria de fluxo também apresentou vantagens sobre a análise de ATP, pois esta foi afetada pelo ATP extracelular liberado de células microbianas durante a ozonização.</p>

Artigo	Metodologia	Corante utilizado	Resultados	Conclusão
<p><b>FOLADORI <i>et al.</i>, 2010</b></p>	<p>Foram coletadas amostras de água ao longo de um sistema de tratamento de águas residuais (residuais brutas, residuais, lodo ativado e efluentes; entende-se como efluente a água liberada do segundo colonizador). Tais amostras foram submetidas a dois procedimentos a fim de dispersar agregados grosseiros (ultrassonografia e tratamento mecânico). Uma parte das amostras foi submetida a ultrassonografia e outra parte a tratamento mecânico, ambos a fim de dispersar agregados grosseiros. A suspensão resultante de cada amostra foi filtrada e subdividida em duas sub-amostras, a primeira corada com uma combinação de corantes fluorescentes, e a segunda com um substrato fluorogênico, a fim de avaliar a biomassa viável (células viáveis coradas em verde e mortas em vermelho) ou ativa respectivamente. Em seguida as amostras foram analisadas por citometria de fluxo em dois aparelhos diferentes: um com laser de Ar e o outro com lâmpada Xenon de arco curto. Paralelamente foram analisados sólidos suspensos totais (TSS), sólidos suspensos voláteis (VSS) e a demanda química de oxigênio (DQO) de acordo com o <i>Standard Methods</i>.</p>	<p>Combinação de corantes fluorescentes: SYBR-Green I e Propidium Iodide</p> <p>Substrato fluorogênico: 2', 7'-bis-(2-carboxietil)-5-(e-6)-éster acetoximetil carboxifluoresceína (BCECF-AM)</p>	<p>Ao comparar os métodos de dispersão de agregados observou-se que no mecânico não foi possível padronizar a intensidade das forças de cisalhamento enquanto que na ultrassonografia pôde-se utilizar uma energia específica. Nas amostras provenientes dos efluentes apenas a homogeneização em vortex foi suficiente para dispersar os agregados, devido ao baixo conteúdo. Agregados pequenos, não retidos pelo filtro, foram contados como partículas únicas, desvantagem parcialmente contornada, pois o biovolume real de cada partícula foi levado em consideração no cálculo da biomassa bacteriana. Pequenos agregados em lodo ativado apresentou biovolume 2,6 vezes maior que células viáveis. O cálculo de células totais foi a soma de viáveis, mortas e pequenos agregados. A água residual bruta após passar pelo colonizador primário recebe o nome de água residual, e possui 54% menos de DQO e 25% menos de bactérias totais, enquanto que no lodo ativado a concentração de bactérias totais foi maior. Na amostra proveniente do efluente observou-se concentração de bactérias diminuída em 3 ordens de grandeza, que estava de acordo com a baixa concentração de DQO. A água residual bruta teve maior porcentagem</p>	<p>O conhecimento da biomassa bacteriana é um parâmetro fundamental no gerenciamento de sistemas de tratamento de águas residuais. A citometria de fluxo apresentou resultados analíticos estatisticamente representativos devido ao elevado número de bactérias que podem ser quantificadas por meio desta técnica, permitindo não só análises rápidas mas também proporcionando análises de um maior número de amostras por dia.</p>

			<p>de células mortas que o lodo ativado, sendo que em efluentes e lodo ativado a concentração foi semelhante. O biovolume de bactérias viáveis em lodo ativado foi menor que em água residual bruta e água residual, enquanto que o efluente apresentou valores menores. A proporção média de biomassa ativa / viável foi de 47% e 30% em águas residuais brutas e residuais, respectivamente. Em lodo ativado, essa proporção era de 45%, a qual foi mantida em efluentes.</p>	
--	--	--	---	--

## 4.5 CONCLUSÃO

A citometria de fluxo é uma metodologia alternativa quantitativa baseada na medida direta da viabilidade, sendo portanto independente do cultivo celular, apresentando como vantagens não apenas a emissão de resultados precisos de forma rápida mas também a detecção dos VNC presentes em ambientes aquáticos. A mesma mostrou-se satisfatória quando comparada as metodologias convencionais para análise de água, destacando-se ainda que a combinação dos corantes SYBR Green I e PI foi a mais utilizada. Por outro lado, foram perceptíveis limitações em alguns dos equipamentos empregados, o que pode ser superado com o emprego de *softwares* apropriados.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

BERNEY, M.; VITAL, M.; HÜLSHOFF, I.; WEILENMANN, H.U.; EGLI, T.; HAMMES, F. Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water. **Water Res.**, Oxford, v. 42, p. 4010-4018, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Primeiro Suplemento da Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2016.

BRITISH SOCIETY FOR IMMUNOLOGY'S. **Flow cytometry (1978)**. Disponível em: <https://www.immunology.org/flow-cytometry-1978>. Acesso em: 20 dez. 2018.

CATALA, P.; PARTHUISOT, N.; BERNARD, L.; BAUDART, J.; LEMARCHAND, K.; LEBARON, P. Effectiveness of CSE to counterstain particles and dead bacterial cells with permeabilised membranes: application to viability assessment in waters. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 178, p. 219 - 226, 1999.

COONS, A.H.; KAPLAN, M.H. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. **J. Exp. Med.**, New York, v. 91, n. 1, p. 1-13, 1950.

CUNDELL, A. M. Microbial monitoring of potable water and water for pharmaceutical purposes. In: JIMENEZ, L. **Microbial contamination control in the pharmaceutical industry**. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 45-75.

DÍAZ, M.; HERRERO, M.; GARCÍA, L. A.; QUIRÓS, Q. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. **Biochem. Eng. J.**, Amsterdam, v. 48, p. 385-407, 2010.

FOLADORI, P.; BRUNI, L.; TAMBURINI, S.; ZIGLIO, G. Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. **Water Res.**, Oxford, v. 44, p. 3807-3818, 2010.

GIVAN, A.L. Chapter 2 Principles of flow cytometry: An overview. **Method Cell Biol.**, v. 63, p. 19-50, 2001.

GRÉGORI, G.; CITTERIO, S.; GHIANI, A.; LABRA, M.; SGOBATI, S.; BROWN, S.; DENIS, M. Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and

marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4662 - 4670, 2001.

GUCKER JUNIOR, F. T.; O'KONSKI, C. T.; PICKARD, H. B.; PITTS JUNIOR, J. N. A photoelectronic counter for colloidal particles. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 69, n. 10, p. 2422-2431, 1947.

HAMMES, F.; BERNEY, M.; WANG, Y.; VITAL, M.; KÖSTER, O.; EGLI, T. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. **Water Res.**, Oxford, v. 42, p. 269–277, 2008.

HULETT, H. R.; BONNER, W. A; SWEET, R. G; HERZENBERG, L. A. development and application of a rapid cell sorter. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 19, n. 8, p. 813-6, 1973.

INSTITUTE OF VALIDATION TECHNOLOGY. **Approaching the selection of rapid microbiological methods**. Burlington (MA): IVT Network, 2014. Disponível em: <http://www.ivtnetwork.com/article/approaching-selection-rapid-microbiological-methods>. Acesso em: 9 maio 2018.

JOUX, F.; LEBARON, P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. **Microbes Infect.**, Paris, v. 2, n.12, p.1523-1535, 2000.

KAWAI, M.; MATSUTERA, E.; KANDA, H.; YAMAGUCHI, N.; TANI, K.; NASU, M. 16S Ribosomal DNA-Based Analysis of Bacterial Diversity in Purified Water Used in Pharmaceutical Manufacturing Processes by PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 68, n. 2, p. 699–704, 2002.

MANSBERG, H. P.; SAUNDERS, A. M.; GRONER, W. The hemalog d white cell differential system. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v. 22, n.7, p. 711-724, 1974.

MATTERN, C. F.; BRACKETT, F. S.; OLSON, B. J. Determination of number and size of particles by electrical gating: blood cells. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v. 10, n. 1, p. 56-70, 1957.

MOLDAVAN, A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. **Science**, New York, v. 80, n. 2069, p. 188-189, 1934.

MONFORT, P.; BALEUX, B. Comparison of flow cytometry and epifluorescence microscopy for counting bacteria in aquatic ecosystems. **Cytometry**, New York, v. 13, p. 188-192, 1992.

PARÁ (Estado). Ministerio Público. **Água e saúde**. Belém: MAPPA, 2011. Disponível em <https://www2.mppa.mp.br/sistemas/gcsubsites/upload/41/Agua%20e%20Saude%20-%20Organizacao%20Pan-Americana%20da%20Saude.pdf>. Acesso em: 29 dez. 2018.

PARVEEN, S.; KAUR, S.; DAVID, S. A. W.; KENNEY, J. L.; MCCORMICK, W. M. M.; GUPTA, R. K. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products. **Vaccine**, Amsterdam, v. 29, n. 45, p. 8012-8023, 2011.

PETERS, D.; BRANSCOMB, E.; DEAN, P.; MERRILL, T.; PINKEL, D.; VAN DILLA, M.; GRAY, J. W. The LLNL High-speed Sorter: Design features, operational characteristics, and biological utility. **Cytometry**, New York, v. 6, n. 4, p. 290-301, 1985.

PIANETTI, A.; FALCIONI, T.; BRUSCOLINI, F.; SABATINI, L.; SISTI, E.; PAPA, S. Determination of the Viability of *Aeromonas hydrophila* in Different Types of Water by Flow Cytometry, and Comparison with Classical Methods. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 71, n. 12, p. 7948-7954, 2005.

PICOT, J.; GUERIN, C.L.; VAN KIM, C.L.; BOULANGER, C.M. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. **Cytotechnology**, v. 64, 109–130, 2012.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2015. 416 p.

PONTORIERO, G.; POZZONI, P.; ANDRULLI, S.; LOCATELLI, F. The quality of dialysis water. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Berlin, v. 18, suppl. 7, p. vii21–vii25, 2003.

PORTER, J.; EDWARDS, C.; PICKUP, R. W. Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 79, n. 4, p. 399-408, 1995.

ROSSI, A. C. R.; PORTO, E. **A importância da elaboração de procedimentos de higienização considerando a presença de biofilmes**. São Paulo: SBCC - Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, 2009. Disponível em:

[http://roneiandre.dominiotemporario.com/doc/39-import\\_higieniz.pdf](http://roneiandre.dominiotemporario.com/doc/39-import_higieniz.pdf) . Acesso em: 29 dez. 2018.

SANDLE, T. Assessment of the suitability of R3A agar for the subculture of microorganisms isolated from pharmaceutical water systems. **Eur. J. Parenter. Pharm. Sci.**, Haslemere, v. 19, n. 3, p. 85-94, 2014.

SANDLE, T. Characterizing the microbiota of a pharmaceutical water system-A metadata study. **SOJ. Microbiol. Infect. Dis.**, Normal, v. 3, n.2, p. 1-8, 2015.

SHAPIRO, H. M. The evolution of cytometers. **Cytometry A**, Hoboken, v. 58A, n. 1, p. 13-20, 2004.

SILVA, A. M. M.; MARTINS, C. T. B.; FERRABOLI, R.; JORGETTI, V.; ROMÃO JUNIOR, J. E. Revisão/Atualização em diálise: água para hemodiálise. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 180-188, 1996.

SPOERING, A. L.; LEWIS, K. Biofilms and planktonic cells of pseudomonas aeruginosa have similar resistance to killing by antimicrobials. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 183, n. 23, p. 6746 – 6751, 2001.

STEEN, H. B.; BOYE, E.; SKARSTAD, K.; BLOOM, B.; GODAL, T.; MUSTAFA, S. Applications of flow cytometry on bacteria: cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. **Cytometry**, v. 2, n. 4, p. 249-257, 1982.

STEINKAMP, J. A.; ORLICKY, D. A.; CRISSMAN, H. A. Dual-laser flow cytometry of single mammalian cells. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v. 27, n. 1, p. 273-276, 1979.

SUTTON, S.; SINGER, D. Microbiological Best Laboratory Practices, USP <1117> – Value and Recent Changes to a Guidance of Quality Laboratory Practice with Don Singer. **Am. Pharm. Rev.**, v. 14, n. 4, p.41-47, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TUTUNJI, V. L. Guerra biológica: uma revisão. **Univ., Ciênc. Saúde**, Brasília, v. 1, n.1, p. 105-139, 2003.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 40. ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2017.

VAN DILLA, M. A.; LANGLOIS, R. G.; PINKEL, D.; YAJKO, D.; HADLEY, W. K. Bacterial characterization by flow cytometry. **Science**, New York, v. 220, n. 4597, p. 620- 622, 1983.

VAN DILLA, M. A.; TRUJILLO, T. T.; MULLANEY, P. F.; COULTER, J. R. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. **Science**, New York, v. 163, n. 3872, p. 1213-1214, 1969.

## *5 Considerações Finais*



A contaminação da água tratada para diálise e do dialisato podem expor pacientes em tratamento hemodialítico ao risco, para isso é de fundamental importância que a legislação vigente no país seja mais criteriosa, determinando análise mensal de endotoxinas também no dialisato. Na rotina laboratorial são empregados métodos convencionais, porém devido a suas limitações podem ocasionar risco a vida de pacientes.

Neste contexto métodos que resultem em análises mais sensíveis e em menor tempo são desejáveis para permitir ações corretivas imediatas a fim de preservar a segurança dos pacientes. Porém antes de ser incorporado na rotina laboratorial os mesmos devem ser validados.

Nos estudos empregando o PTS<sup>®</sup> os resultados obtidos permitiram concluir positivamente quanto a validação indicando ter potencial para aplicabilidade na rotina laboratorial. Entretanto ao ser comparado com o método convencional em uma rotina laboratorial envolvendo várias análises diárias mostrou-se mais demorado. Contudo para poucas análises *in loco*, é vantajoso, pois permite análises em tempo real. Destaca-se limitação observada para o PTS<sup>®</sup> em amostras com níveis de endotoxina superiores a 0,25UE/mL (nível de limites no ensaio qualitativo convencional) pois os resultados quantificados obtidos no PTS<sup>®</sup> mostraram-se inferiores a este nível.

A citometria de fluxo, potencial metodologia alternativa para a enumeração de bactérias heterotróficas, se mostrou bastante promissora sendo recomendável sua validação e aplicabilidade principalmente em sistemas de água para diálise e dialisato, com vistas a minimizar o risco à contaminação a qual o paciente pode ser exposto.



# *Anexos*

