



Validação do PTSTM (Portable Test System) para Ensaio de Endotoxina em Radiofármacos (18-FDG)

Ralph SANTOS-OLIVEIRA

*Instituto de Engenharia Nuclear – Divisão de Radiofarmácia,
Rua Hélio de Almeida, 75 - Rio de Janeiro-RJ, Brasil*

RESUMO. O presente estudo foi realizado visando a validação do PTSTM (Portable Test System) como metodologia padrão para ensaio de endotoxina em radiofármacos (18-FDG). A análise foi guiada pela Resolução Anvisa RE 899/2003. Os resultados demonstram adequação da técnica à rotina de radiofármacos, mesmo que no quesito exatidão os resultados tenham sido desfavoráveis a sua utilização. Contudo, avaliando-se o benefício de seu uso, a técnica mostrou-se uma alternativa ao teste farmacopéico atual.

SUMMARY. “Validation of PTS for Radiopharmaceuticals Endotoxin Test”. The endotoxin test is an important parameter for medicines, specially the radiopharmaceuticals one, since the presence of endotoxin can be dangerous. Nowadays, two techniques are been used for radiopharmaceuticals endotoxin test. First, the traditional one, the BET (Bacterial Endotoxin Test) described in United States Pharmacopoeia. Second the PTSTM (Portable Test System) approved by the FDA. However, since the PTSTM is not a pharmacopoeial test he must be validated before been used for routine. The present study was conducted to validated the PTSTM as standard methodology for endotoxin assay. The results, except accuracy, were good. Although the results of accuracy were not good this technique seems to be a important alternative test, especially for radiopharmaceuticals.

INTRODUÇÃO

Os radiofármacos são medicamentos com finalidade curativa e diagnóstica. Seu uso vem crescendo juntamente com a disseminação da Medicina Nuclear e atualmente encontra-se em posição de destaque ¹. Uma das grandes preocupações relativas aos radiofármacos encontra-se no seu breve período de validade, que varia de acordo com a meia-vida física do radioisótopo constituinte de sua composição. Dentre os diversos radioisótopos utilizados na produção de radiofármacos, o F-18 (fluoreto-18) destaca-se pelo seu curto tempo de meia-vida física, na ordem de 120 min. Essa característica, por sua vez, obriga à procura de métodos cada vez mais rápidos para a realização dos ensaios de controle de qualidade, tanto físico-químico, quanto biológico e microbiológico. Contudo, especial

atenção é dada aos ensaios biológico e microbiológico de radiofármacos, devido ao longo tempo que levam, em média 1 h para os ensaios microbiológicos e 7 dias para os ensaios biológicos, utilizando as técnicas farmacopéicas atualmente disponíveis.

Dentre os radiofármacos a base de F-18, o 18-F-fluorodesoxiglicose (18-FDG) é o mais representativo e atualmente um dos radiofármacos mais utilizados no mundo. Sendo para uso injetável em pacientes com diversas enfermidades, o 18-FDG deve, portanto, contemplar com todas as exigências legais para medicamentos injetáveis, dentre eles, o ensaio de endotoxina ².

O ensaio de endotoxina é o principal parâmetro para a qualidade microbiológica de medicamentos, sendo a LAL (Limulus Amebocyte Ly-sate) o método de escolha para sua realização.

PALAVRAS CHAVE: Endotoxina, Ensaio microbiológico, Endosafe®, LAL.

KEY WORDS: Endotoxin, Endosafe®, LAL, Microbiological assay.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada: *E-mail*: roliveira@ien.gov.br

O procedimento de execução do teste leva em torno de 1 h, tempo suficiente para reduzir à metade a atividade de um radiofármaco a base de 18-F.

O PTS™ (Portable Test System™) é um novo equipamento de ensaio de endotoxina. Nele, encontra-se afixado em um cartucho acrílico, reagentes para LAL (Limulus Amebocyte Lysate) liofilizados, que em contato com a amostra líquida processam uma reação cromogênica. A intensidade do complexo cromógeno formado dessa reação será indicativo da presença ou não de endotoxina na amostra. Os resultados são interpolados em uma curva padrão e então comparados com a curva padrão arquivada na memória do equipamento, e expresso em EU/mL.

A principal vantagem do PTS™ para os radiofármacos é seu tempo de realização, que leva em média 15 min frente ao período de 1 h para o método tradicional farmacopéico. Contudo, como todo novo equipamento e metodologia, deve ser validado.

O objetivo desse estudo foi validar o PTS™ como teste padrão de endotoxina para o 18-FDG, considerando o BET (Bacterial Endotoxin Test) como ensaio padrão.

O processo de validação foi guiado pela Resolução RE N° 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária ³. De acordo com a resolução, o ensaio de endotoxina pode ser interpretado como pertencente a Categoria III e nessa categoria, um teste somente é mandatório ser realizado, o teste de reprodutibilidade. Entretanto, de modo a se ter uma base estatística razoável, considerando-se a relevância do teste para medicamentos injetáveis, alguns outros parâmetros também foram avaliados.

METODOLOGIA

A metodologia seguida na validação do PTS™ para o radiofármaco 18-FDG foi estabelecida com base na Resolução RE 899/03 (Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos) ³. Na tentativa de se obter um amostral significativo 30 ensaios consecutivos com amostras de 18-FDG foram feitos, a partir da produção rotineira do Instituto de Engenharia Nuclear.

O teste de LAL foi realizado tal qual descrito na USP farmacopéia (Bacterial Endotoxins Test – BET). Os seguintes reagentes foram usados: Solução padrão de endotoxina (CSE); Lisado de Limulus Amebocyte padrão da Cambrex® na concentração de 0,25 e tubos plásticos despirogenizados da (Endosafe™). Os ensaios foram realizados usando 100 µl de amostra e 100 µl do

LAL por tubo, incubados em numa incubadora ELETROLAB™ a uma temperatura média de 37 ± 1 °C, for 60 ± 2 min ^{4,5}. A formação do gel era cuidadosamente checada, invertendo-se o tubo em um ângulo de 180°. A formação do gel é indicação positivo de presença de endotoxina e a não formação indicação negativa da presença de endotoxina ^{6,7}. O equipamento a ser validado era um Endosafe® PTS™ com kit de execução do teste da Charles River Laboratories™. A metodologia utilizada na realização do teste pelo Endosafe® (PTS™) foi a descrita no equipamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Linearidade

Linearidade pode ser definida como a capacidade de uma metodologia demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em um intervalo especificado ³. No caso do teste de endotoxina o analito é a concentração de endotoxina.

Os valores obtidos da análise pelo equipamento encontra-se na Tabela 1. A Figura 1 representa os valores da Tabela 1 na perspectiva dispersiva, enquanto a Figura 2 é uma representação linear dos pontos. A partir do Figura 2 fez-se o cálculo do R ao quadrado assim como da equação da reta. Na Tabela 3, está disposto uma comparação entre o teste realizado pelo PTS™ e o teste realizado pelo método farmacopéico tradicional (BET-LAL), de forma a auxiliar na visualização da discrepância de algum resultado.

Embora na Figura 1 o comportamento da reta pareça estar comprometido pelos quatro pontos fora da curva, quando se faz a interpolação do pontos, e calcula-se o R², percebe-se que os pontos não representam um diferencial tão grande para o amostral (30 pontos) total. Ou se-

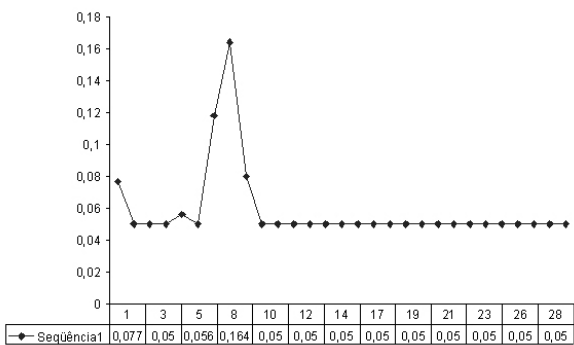


Figura 1. Representação da Dispersão dos Pontos do Amostral Analisado.

Amostra	Leitura em Eu/mL	Amostra	Leitura em Eu/mL
1	0,077	17	0,05
2	0,05	18	0,05
3	0,05	19	0,05
4	0,05	20	0,05
5	0,05	21	0,05
6	0,118	22	0,05
7	0,164	23	0,05
8	0,08	24	0,05
9	0,05	25	0,05
10	0,05	26	0,05
11	0,05	27	0,05
12	0,05	28	0,05
13	0,05	29	0,05
14	0,05	30	0,05
15	0,05	Média	0,058448
16	0,05	Desvio padrão	0,025238

Tabela 1. Valores da análise de Endotoxina no PTSTM.

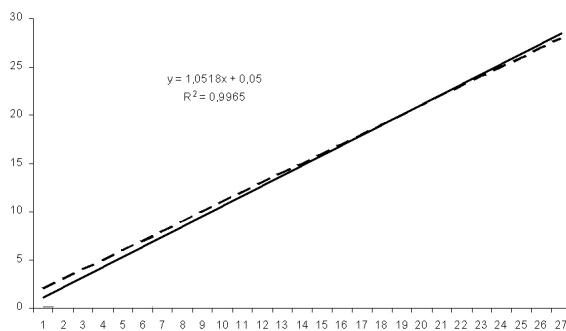


Figura 2. Representação Linear dos dados da Tabela 1 com a obtenção por Excel da equação da reta e do R².

ja, a média dos valores não foi muito afetada pelos quatro pontos, e assim, tanto o desvio padrão como o coeficiente de variação não sofreram grande interferência. É importante ressaltar, que embora os valores das amostras 1, 6, 7 e 8 tenham sido diferente de 0,05 EU/mL eles ainda continuavam dentro do limite de aceitabilidade para radiofármacos que de acordo com a USP 2004 é de 0,25 EU/mL. A diferença entre o ponto mais distante da reta e o valor limite da USP foi de 0,086 EU/mL que representa ainda uma boa margem de segurança. Não obstante, na sequência de dados, não foi mais observado esse tipo de desvio.

O R-quadrado, que mede a proporção da variabilidade em Y que é explicada por X. É uma função direta da correlação entre as variáveis.

Amostras	Valores em EU/mL	Amostras	Valores em EU/mL
1	0,05	9	0,05
2	0,05	10	0,05
3	0,05	11	0,05
4	0,05	12	0,05
5	0,05	13	0,05
6	0,05	14	0,05
7	0,05	Média	0,05
8	0,05	Desvio padrão	0

Tabela 2. Valores de Reprodutibilidade.

Um valor de R-quadrado muito próximo de um indica uma forte relação entre as duas variáveis. Em resumo, quanto mais próximo de um o R-quadrado for, mais linear são seus dados. No caso em questão o R-quadrado foi de 0,996 considerando-se os pontos 1, 6, 7 e 8. Desta forma, pode sugerir que os resultados de linearidade do equipamento indicam seu uso para análise de endotoxina para o 18-FDG, pois apresenta uma boa linearidade.

Repetibilidade

A repetibilidade representa a precisão do método sob as mesmas condições operacionais, num curto período de tempo. Ou seja, a capacidade do método de fornecer o mesmo resultado da mesma amostra sob a mesma condição. Nesse caso amostras iguais foram repetidas duas vezes. Os valores encontram-se representados na Tabela 2.

Os valores obtidos pela análise estatística do dados referente a repetibilidade do equipamento sugerem que o equipamento apresenta elevada repetibilidade. Um desvio padrão igual a zero, sugere que das amostras avaliadas para o teste de repetibilidade, todas apresentaram o mesmo valor. Ou seja, a diferença entre a média e o valor unitário de cada amostra foi zero.

A avaliação da Tabela 3 permite visualizar uma correlação aceitável entre ambos os testes. Os resultados obtidos no PTSTM tem correlação com os resultados obtidos pelo teste farmacopéico. Mesmo nos pontos onde os valores foram diferentes de 0,05 EU/mL, os resultados são aceitáveis, pois embora diferente de 0,05 EU/mL continuam sendo os resultados inferiores a 0,25 EU/mL, e portanto, aprovados no ensaio microbiológico.

Exatidão

A avaliação da exatidão corresponde a um

Amostras	PTS (EU/mL)	Farmacopéia	Amostras	PTS (EU/mL)	Farmacopéia
1	0,077	Aprovado	16	0,05	Aprovado
2	0,05	Aprovado	17	0,05	Aprovado
3	0,05	Aprovado	18	0,05	Aprovado
4	0,05	Aprovado	19	0,05	Aprovado
5	0,05	Aprovado	20	0,05	Aprovado
6	0,118	Aprovado	21	0,05	Aprovado
7	0,164	Aprovado	22	0,05	Aprovado
8	0,08	Aprovado	23	0,05	Aprovado
9	0,05	Aprovado	24	0,05	Aprovado
10	0,05	Aprovado	25	0,05	Aprovado
11	0,05	Aprovado	26	0,05	Aprovado
12	0,05	Aprovado	27	0,05	Aprovado
13	0,05	Aprovado	28	0,05	Aprovado
14	0,05	Aprovado	29	0,05	Aprovado
15	0,05	Aprovado	30	0,05	Aprovado

Tabela 3. Comparação dos Resultados Obtidos pelo Teste via PTS™ e via BET-LAL (Farmacopéia). Aprovado: não formou gel (clot) no ensaio farmacopéico do LAL.

Amostra Padrão (EU/mL)	Leitura (EU/mL)		Média	Desvio Padrão	CV (%)
0,125	0,233	0,254	0,2435	0,014849	6,098
0,25	0,193	0,200	0,1965	0,00495	2,51

Tabela 4. Valores das Soluções Padrão de Endotoxina analisadas pelo PTS™.

importante parâmetro na validação de equipamentos e técnicas. É por meio da análise da exatidão que verificar-se-a o grau de concordância entre os resultados individuais e o aceite como referência ⁸.

Nesse sentido, soluções padrão de endotoxina (Cambrex®) nas concentrações de 0,25 EU/mL e 0,125 EU/mL foram analisadas no equipamento, nas mesmas condições sugeridas para a realização dos testes. Os resultados estão dispostos na Tabela 4.

A análise dos dados mostrou que ambos os ensaios realizados para avaliação da exatidão apresentaram resultados significativamente diferentes, com impacto grande na aceitação do equipamento para realização de teste de rotina. Todavia os resultados concernentes a repetibilidade apresentaram-se de forma aceitável.

De modo geral e respeitando-se as normas vigentes, o método PTS™ mostrou-se bem eficaz na determinação de endotoxina em radiofármacos, mas particularmente no radiofármacos em questão (18-FDG). Entretanto, estudos como o de Hung *et al.* ⁹ demonstraram que o PTS™ pode apresentar interferência nos dados devido a emissão de radiação. Sendo assim, estudos mais aprofundados sobre a interferência da radiação no equipamento devem ser realizados.

CONCLUSÃO

Os radiofármacos representam hoje importante classe de medicamentos em uso no mundo e desde 2006 o Brasil vem lutando em prol da sua regularização e reconhecimento.

A validação de metodologias e equipamentos é técnica rotineira em fábricas e laboratórios e importante ferramenta na qualidade do produto (medicamento) final. Devendo sua realização ser estimulada em todos os aspectos.

Desde a criação do CTT (Comitê Técnico Temático) de Radiofarmácia na Farmacopéia Brasileira esforços vem sendo feitos para a validação de métodos, técnicas e equipamentos utilizados na produção de radiofármacos, na tentativa de auxiliar tecnicamente sua regulamentação.

O teste de endotoxina, ensaio de suma importância para medicamentos injetáveis, representa hoje parâmetro fundamental. Contudo, o teste padrão – farmacopéico – leva muito tempo, fato que para os radiofármacos é de substancial interferência na sua atividade final. Testes mais rápidos, como o PTS™, que possam suprir essa necessidade passam a ser de grande estima para quem trabalha em radiofarmácia e podem vir a assumir um caráter de técnica alternativa.

Os resultados demonstraram que o PTS™

pode ser utilizado como teste padrão para 18-FDG embora os resultados relativos a exatidão necessitam de estudos mais aprofundados. Ensaaios adicionais, em particular, referente a interferência da radiação, também devem ser frutos de pesquisa posterior.

REFERÊNCIAS

1. Santos-Oliveira, R. (2009) *Toboku J. Exp. Med.* **217**: 251-7.
2. Santos-Oliveira, R, A.M.A. Carneiro-Leão & S.W. Smith (2008) *An. Acad. Bras. Cienc.* **80**: 665-75.
3. Brasil – Anvisa (2003) Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Publicada no Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.
4. Zijlstra, S., P. Gerhen, C. Rechin, R. Wortmann & G. Nolotramiprodo (1997) *Appl. Radiat. Isot.* **48**: 51-4.
5. Watchel, R.E. & K.Tsuji (1977) *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1265-9
6. Fukumori, N.T.O., A.V. Fernandes, D.G. Campos, A.C. Gomes, N.G. Silva, N.P.S. Pereira, C.P.G. Silva & M.N. Matsuda (2007) *A challenge for the validation of the gel clot test in radiopharmaceuticals produced in the radiopharmacy centre*, p. 1-6. In proceedings of the 7th International Nuclear Atomic Conference, Santos, São Paulo.
7. Food and Drug Administration (1987) *Guideline on validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products and medical devices*. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, pp.22-4.
8. Swartz, M.R., , I.S. Krull (1998) *Pharm. Technol.* **54**: 12-20.
9. Hung, F.C., B.C. Iverson, M.S. Jacobson & D.W. Mahoney (2005) *Nucl. Med Commun.* **26**: 869-74.