

STUDII DE VALIDARE PENTRU METODA DE DETERMINARE A PROTEINEI DIN "MALEINA PPD" PRIN METODA KJELDAHL

STUDIES OF METHOD FOR DETERMINING THE PROTEIN CONCENTRATION OF "MALEIN PPD" BY THE KJELDAHL METHOD

Viviana Ciuca¹, Victorita Burghilea¹, V. V. Safta²,
Despina Nita¹, Luciana Paraschiv¹

¹ SN Institutul Pasteur SA,

² Universitatea Politehnica din Bucuresti

Cuvinte cheie: *Burkholderia mallei*, *Kjeldahl method*, *azot proteic*.

Key words: *Burkholderia mallei*, *Kjeldahl method*, *nitrogen from protein molecule*.

Rezumat

Maleina PPD este un derivat proteic purificat de *Burkholderia mallei* Cal S. Produsul de diagnostic contine max 2mg/ml *Burkholderia mallei*. Principala caracteristică a produsului comercial este concentrația în proteina. Morva este o boală contagioasă și fatală de cai, măgari și catări, cauzate de infecția cu bacteria *Burkholderia mallei*. Agentul patogen produce noduli și ulcerații la nivelul tractului respirator superior și plămâni. Boala este transmisibilă la om prin contactul direct cu animalele bolnave sau cu un material infectat sau contaminat. În boala acută netratată, rata mortalității poate ajunge la 95% în decurs de 3 săptămâni. Cantitatea de proteine din produsul biologic "Maleina PPD" este măsurată ca azot din molecula proteică, aplicând metoda Kjeldahl (determinarea azotului prin digestie cu acid sulfuric). Studiul de validare își propune să demonstreze că determinarea proteinei din Maleina PPD, este o metodă analitică adecvată, reproductibilă și îndeplinește cerințele de calitate ale reagentului de diagnostic. Lucrarea stabilește caracteristicile de performanță ale metodei considerate și identifică factorii care influențează aceste caracteristici. Procedura de validare include detalii privind protocolul de lucru al determinării proteinei din Maleina PPD, criteriile de validare, rezultate experimentale, calcule matematice.

Abstract

Glanders is a contagious and fatal disease of horses, donkeys, and mules, caused by infection with the bacterium *Burkholderia mallei*. The pathogen causes nodules and ulcerations in the upper respiratory tract and lungs. Glanders is transmissible to humans by direct contact with diseased animals or with infected or contaminated material. In the untreated acute disease, the mortality rate can reach 95% within 3 weeks. Malein PPD - the diagnostic product contain max 2mg/ml *Burkholderia mallei*. The amount of protein in the biological product "Malein PPD" is measured as nitrogen from protein molecule, applying the Kjeldahl (method determination of nitrogen by sulphuric acid digestion). The validation study aims to demonstrate the determination of the protein of the Malein PPD, by sulphuric acid digestion, it is an appropriate analytical method, reproducible and meets the quality requirements of diagnostic reagents. The paper establishes the performance characteristics of the method considered and identify the factors that influence these characteristics. The method for determining the concentration of protein, by the Kjeldahl method is considered valid if the results obtained for each validation parameter are within the admissibility criteria. The validation procedure includes details on protocol working to determine the protein of the Malein PPD, validation criteria, experimental results, mathematical calculations.

1. Introducere

Maleina PPD este un derivat proteic purificat de *Burkholderia mallei* Cal S. Produsul de diagnostic conține max 2 mg/ml *Burkholderia mallei*. Principala caracteristică a produsului comercial este concentrația în proteina (1, 2).

Morva este o boală contagioasă și fatală de cai, măgari și catări, cauzate de infecția cu bacteria *Burkholderia mallei*.

Agentul patogen produce noduli și ulcerații la nivelul tractului respirator superior și plămâni. Boala este transmisibilă la om prin contactul direct cu animalele bolnave sau cu un material infectat sau contaminat.

În boala acută netratată, rata mortalității poate ajunge la 95% în decurs de 3 săptămâni (Neubauer și colab., 1997).

Calitatea reagentului de diagnostic este garantată atât timp cât acesta este controlat în mod constant cu ajutorul metodei de analiză descrisă în dosarul de înregistrare.

Studiul de validare își propune să demonstreze că determinarea proteinei din Maleina PPD este o metodă de analiză adecvată, reproductibilă și îndeplinește cerințele de calitate ale reagentului de diagnostic (1, 2, 4, 5, 6).

2. Material și Metodă

Cantitatea de proteine din produsul biologic "Maleina PPD" este măsurată ca azot din molecula proteică, aplicând metoda Kjeldahl (determinarea azotului prin digestie cu acid sulfuric) (2).

În figurile 1-3 inserate sunt prezentate faze ale pregătirii probelor

Precipitarea proteinelor din produsul biologic

- Se pipetează în cupe de centrifugă câte 2 ml proba și 2,5 ml acid tricloracetic 40%. Se agită bine și se lasă la rece 24h pentru precipitarea completă.
- Se centrifughează 30 minute la 3000-4000 rpm și apoi se decantează cu grijă supernatantul iar precipitatul se dizolvă cu 0,5 ml soluție de NaOH 5N.
- După dizolvarea completă a precipitatului se transvazează într-o fiolă de mineralizare de 200 ml. Cupa se spală de 3 ori cu o cantitate minimă de apă distilată.

Distilarea amoniacului

Eliberarea amoniacului prin descompunerea sulfatului de amoniu și distilarea amoniacului se face cu ajutorul distilatorului VELP, conform instrucțiunilor de lucru. În fiola cu produsul mineralizat se adaugă apă distilată până la un volum de 30 ml, apoi se distilă cu 60 ml NaOH 33%.

Distilatul se reia în 20 ml H₂SO₄ N/50 și 0,3 ml indicator Cooper.



Mineralizarea proteinelor

- În fiola de mineralizare cu proba se adaugă 5 ml H₂SO₄ concentrat și aproximativ 3g din amestecul de catalizatori.
- Se așează balonul la mineralizare în digestorul Velp, timp de 23 min, la 420 °C.



Dozarea amoniacului

Excesul de H₂SO₄ N/50 nereacționat cu amoniacul este titrat cu soluție de NaOH N/50 până la colorația albastră. Diferența dintre numărul de ml de H₂SO₄ N/50 puși inițial și cei găsiți prin titrare cu soluția de NaOH N/50 reprezintă numărul de ml de acid sulfuric reacționați cu amoniacul.



2.1. Calculul rezultatelor

1 ml H₂SO₄ N/50 corespunde la 0,28 mg N₂. Cunoscând volumul de H₂SO₄ N / 50 care a reacționat cu amoniacul prin înmulțirea cu 0,28 aflăm cantitatea de azot din produsul biologic, exprimată în mg/ml.

Se considera că N₂ din proteine constituie în medie 16%.

Formula de calcul:

- **mg proteina / ml proba** = $(V_1F_1 - V_2F_2) \times 0,28 \times 6,25 / 2$
- **V₁** = volumul de H₂SO₄ N/50 în lucru, ml
- **F₁** = factorul soluție de H₂SO₄ N/50
- **V₂** = volumul NaOH N/50 folosit la titrare
- **F₂** = factorul soluției de NaOH N/50

Echipamente utilizate:

- balanta analitica,
- digestorul Velp,
- distilatorul Velp,
- fiole Velp,
- baloane cotate,
- pipete gradate,
- flacoane Erlenmayer,
- biureta semiautomata.

Reactivi și materiale utilizate:

- acid sulfuric concentrat (H₂SO₄; M = 98,08; d=1,84).
- amestec catalizatori: sulfat dipotasic (K₂SO₄) și sulfat de cupru pentahidrat (CuSO₄ x 5H₂O) în proporție de 5 :1.
- hidroxid de sodiu, soluție 33% (NaOH, M = 40): 33 g hidroxid de sodiu, spălat în prealabil cu apa se dizolvă în 60-70 ml apă proaspăt fiartă și răcită și se completează cu același solvent la 100 ml.
- acid sulfuric, soluție N/50 (H₂SO₄; M = 98,08).
- hidroxid de sodiu, soluție N/50 (NaOH, M = 40).
- soluția de hidroxid de sodiu 0,02 N conține 0,800g NaOH în 1000 ml.
- indicatorul Cooper: 0,4 g verde bromcrezol în 100 ml alcool etilic și 0,04g rosu metil în

100 ml alcool etilic se amestecă în părți egale.

- acid tricloracetic (C₂HCl₃O₂; M = 163,4), soluție 40%: 40g acid tricloracetic se dizolvă în 70 ml apă distilată și se aduce la semn cu același solvent în balon cotat de 100 ml.
- hidroxid de sodiu (NaOH, M = 40), soluție 5N: soluția hidroxid de sodiu 5N conține 200g NaOH în 1000 ml apă distilată.
- **substanță de referință:** L-triptofan 99%
- **substanță de referință:** acetanilida 99%
- clorura de amoniu NH₄Cl 99%.
- sucroza, indice de rotație 66.3 - 67.

2.2. Validarea metodei

Parametrii validați

- Repetabilitatea sau precizia intra-testari
- Reproducibilitate sau precizia inter-testari
- Exactitatea (acuratetea) prin material de referință
- Incertitudinea metodei
- Domeniul de valori al metodei

VALIDATION OF THE METHOD		
Criteria of validation	Criteria of admissibility	Results
Repeatability and accuracy intra-testing	SD repeatability ≤ 10% CV repeatability ≤ 10%	X average = 1,833 SD repeatability=0,0760 CV repeatability=4,1492
Reproducibility and accuracy inter-tests	SD reproducibility ≤ 10% CV reproducibility ≤ 10%	X average = 1,822 SD reproducibility=0,10042 CV reproducibility=5,511
Accuracy by reference material	Bias ± 10% Accuracy in 80-120% the range required.	Acuratetea% = (2,142/2)*100 = 107.1 Bias% = [(2,142-2) / 2] * 100 = 7.1
The sensitivity	0.2 mg N / ml	0.14 mg N / ml
Uncertainty k=2, confidence level 96.64%	±30%	$U_{extns} = 2 \times 12.5 \% = 25 \%$

2.2.1. Repetabilitatea sau precizia intra-testari

- Repetabilitate proteina mg/ml,
- Maleina PPD, seria 1, valabilitate 20.04.2017
- Analist 1/ 14.12.2015
- Maleina PPD

ml NaOH 0.02 N	Concentratie proteina mg/ml
17.80	1.92
17.90	1.83
18.00	1.75
17.90	1.83
17.80	1.75
18.00	1.92
Media 17.9	1.833333333
Stdev 0.089442719	0.076070143
CV 0.499679995	4.149280531

Conform ISO 5983-1/2006,

limita de repetabilitate

$r = 0,3\% + 0,008 \times M$ (media rezultatelor independente)

$r = 0,3\% + 0,008 \times 1,83 = 0,314$

2.2.2. Reproductibilitatea sau precizia inter-testari

- Reproductibilitate proteina mg/ml,
- Maleina PPD, seria 1, valabilitate 20.04.2017
- Maleina PPD

Analist 1 si 2 10 si 11.12.2015	Analist 1 si 2 15 si 16.12.2015
17.80	1.92
17.90	1.83
18.00	1.75
17.90	1.83
17.80	1.75
18.00	1.92
18.02	1.73
18.06	1.69
17.89	1.84
17.96	1.78
17.86	1.87
17.78	1.94
18.17	1.6
18.01	1.74
17.84	1.89
17.80	1.92
17.90	1.83
17.95	1.79
17.87	1.86
17.97	1.77
17.81	1.91
18.11	1.65
18.03	1.72
Media 17.914	1.822
Stdev 0.115296719	0.100421335
CV 0.643612363	5.511599045

Conform ISO 5983-1 ianuarie 2006,
limita de reproductibilitate $r = 1,3 + 0,027$
 $\times M$ (media rezultatelor independente)

$$r = 1,3 + 0,027 \times 1,82 = 1,34$$

Se constata ca valoarea bias-ului este în intervalul impus de $\pm 10\%$, acuratetea este în intervalul impus de 80-120%.

2.2.3. Exactitatea (acuratetea) prin material de referinta

Fisa de calcul acuratete BIAS

Acuratete BIAS mg/ml,
MRC: L-Tryptophan, 99%,
Lot: 10182432 / exp 09.2016

Analist 1 14.12.2015

ml NaOH 0.02 N	Concentratie proteina mg/ml
12.20	2.184
12.30	2.156
12.40	2.128
12.40	2.128
12.30	2.156
12.50	2.100
Media 17.9	2.142
Stdev 0.089442719	0.029366648
CV 0.499679995	1.370991958
Acuratete% $= (2.142/2) \times 100 = 107.64\%$	
Bias% $= [(2.142-2)/2] \times 100 = 7.1\%$	
Acuratetea% = 107.64% - inclusa in intervalul 80-120%	
Bias% = 7.1% - inclusa in 10%.	

Domeniul de valori al metodei

Fișa de calcul limita de sensibilitate metoda

Dozare azot mg / mL,
MRC: L-Tryptophan, 99%,
Lot: 10182432 / exp 09.2016

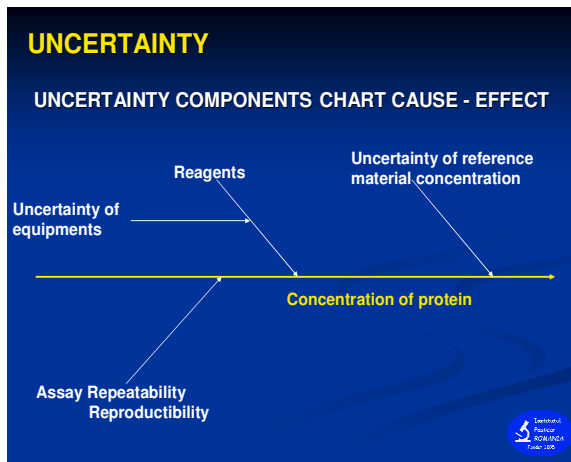
ml NaOH 0.02 N	Concentratie azot mg/ml
18.20	0.50
18.50	0.40
18.90	0.30
19.30	0.20
19.50	0.14
19.50	0.14

Dozare azot mg / mL,
Maleina PPD,
Seria 1, valabilitate 20.04.2017

ml NaOH 0.02 N	Concentratie azot mg/ml
19.00	0.14
18.90	0.15
19.00	0.14
18.90	0.15
19.00	0.14
19.00	0.14

Limita de sensibilitate a metodei este de 0.14 mg N /ml.

2.2.4. Incertitudinea



Incertitudinea este un parametru asociat rezultatului unei măsurări, care caracterizează imprecizia valorilor care, în mod rezonabil, ar putea fi atribuite măsurandului.

Se are în vedere stabilirea clară, fără ambiguități, a expresiei cantitative a valorii măsurandului și a parametrilor de care depinde.

Criterii de performanță:

- se identifică sursele de incertitudine;
- se convertesc componentele incertitudinii în deviații standard fie prin observații directe, fie prin indicații ale certificatelor de calibrare etc;
- se calculează incertitudinea combinată standard;
- se calculează incertitudinea extinsă pentru o probabilitate de 96.64% (cu $k=2$ factor de acoperire).

Conform diagramei Ishikawa, formula de calcul a incertitudinii este:

$$U = \sqrt{U_{\text{reproductibilitate}}^2 + U_{\text{BIAS}}^2 + U_{\text{nasvolum}}^2 + U_{\text{cantarire}}^2}$$

Pentru calcularea incertitudinii s-au introdus în formulele menționate valorile obținute la evaluarea reproductibilității și la calcularea bias-ului.

- $U_{\text{reproductibilitate}}^2 = \text{dev. Std}^2 = 0,10^2 = 0,01$ % azot

- $\text{Bias}\% = 7,1$, mg% azot este de 0,071. Deci: $\text{bias}^2 = 0,005$

- $U_{\text{mas.volum}}$: La măsurarea volumului de 100 ml cu balonul cotate intervin:

- abaterea din certificatul de calitate al balonului ($\pm 0,1$ ml),
- $U_{\text{balon}} = 0,1/\sqrt{3} = 0,0577$
- etalonarea balonului cotate s-a făcut la 20 °C, în timp ce temperatura în laborator variază în limitele ± 4 °C. Incertitudinea datorată acestui efect poate fi calculată din intervalul în care variază temperatura (± 4 °C) și coeficientul de expansiune al volumului de $2,1 \times 10^{-4}$ °C.
- $U_{\text{temp}} = 25 * (\pm 4 \text{ °C}) * 2,1 * 10^{-4} = 0,0084$.
- Incertitudinea rezultată privind distribuția rectangulară a temperaturii: $0,0084 / \sqrt{6} = 0,00343$
- Incertitudinea datorată variațiilor de umplere a balonului cotate: 0.02 ml

$$U_v = \sqrt{0,0577^2 + 0,00343^2 + 0,02^2} = \sqrt{0,0033 + 0,0012 + 0,0004} = \sqrt{0,0049} = 0,07 \text{ ml}$$

Valoarea relativizată: $U_v/V = 0,07/10 = 0,0007$

- La măsurarea volumului de 25 ml cu pipeta intervin abaterea din:
- specificatia de calitate al pipetei ($\pm 0,1$ ml);
- $U_{\text{pipeta}} = 0,1/\sqrt{3} = 0,057$ ml
- etalonarea pipetelor s-a făcut la 20 °C, în timp ce temperatura în laborator variază în limitele ± 4 °C. Incertitudinea datorată acestui efect poate fi calculată din intervalul în care variază temperatura (± 4 °C) și coeficientul de expansiune al apei de $2,1 \times 10^{-4}$ °C.
- $U_{\text{temp}} = 25 * (\pm 4 \text{ °C}) * 2,1 * 10^{-4} = 0,0084$.
- Incertitudinea rezultată privind distribuția rectangulară a temperaturii: $0,0084 / \sqrt{6} = 0,00343$

$$U_v = \sqrt{0,057^2 + 0,00343^2} = \sqrt{0,0032 + 0,000012} = \sqrt{0,0032} = 0,057 \text{ ml}$$

Valoarea relativizata: $U_v/V=0,057/25 = 0,0023$

- La masurarea volumului de 10 ml cu **pipeta** intervine abaterea din:
- specificatia de calitate a pipetei ($\pm 0,05$ ml);

$$U_{\text{pipeta}} = 0,05/\sqrt{3} = 0,0288 \text{ ml}$$

- etalonarea pipetelor s-a facut la 20 °C, in timp ce temperatura in laborator variaza in limitele ± 4 °C. Incertitudinea datorata acestui efect poate fi calculata din intervalul in care variaza temperatura (± 4 °C) si coeficientul de expansiune al apei de $2,1 \times 10^{-4}$ °C.

$U_{\text{temp}} = 10 * (\pm 4 \text{ °C}) * 2,1 * 10^{-4} = 0,0084$.
Incertitudinea rezultata privind distributia rectangulara a temperaturii: $0,0084 / \sqrt{6} = 0,00343$

$$U_v = \sqrt{0,0288^2 + 0,00343^2} = \\ \sqrt{0,00082 + 0,00001} = \\ \sqrt{0,00084} = 0,029 \text{ ml}$$

Valoarea relativizata: $U_v/V = 0,029/10 = 0,0029$

La masurarea volumului de 5 ml cu **pipeta** intervin abaterea din:
- specificatia de calitate al pipetei ($\pm 0,03$ ml);

$$U_{\text{pipeta}} = 0,03/\sqrt{3} = 0,0173 \text{ ml}$$

- etalonarea pipetelor s-a facut la 20 °C, in timp ce temperatura in laborator variaza in limitele ± 4 °C. Incertitudinea datorata acestui efect poate fi calculata din intervalul in care variaza temperatura (± 4 °C) si coeficientul de expansiune al apei de $2,1 \times 10^{-4}$ °C.

$U_{\text{temp}} = 10 * (\pm 4 \text{ °C}) * 2,1 * 10^{-4} = 0,0084$.
Incertitudinea rezultata privind distributia rectangulara a temperaturii: $0,0084 / \sqrt{6} = 0,00343$

$$U_v = \sqrt{0,0173^2 + 0,00343^2} = \\ \sqrt{0,00029 + 0,000012} = \\ \sqrt{0,00031} = 0,018 \text{ ml}$$

Valoarea relativizata: $U_v/V=0,018/5 = 0,0035$

La titrarea probelor s-a folosit o **biureta** de 25 ml, la care intervin urmatoarele abateri:

- Specificatia de calitate a biuretei (± 0.03 ml)

$$U_{\text{biureta}} = 0,03/\sqrt{6} = 0,0122 \text{ ml}$$

- Etalonarea biuretei s-a facut la 20 °C, in timp ce temperatura in laborator variaza in limitele ± 4 °C.
- Incertitudinea datorata acestui efect poate fi calculata din intervalul in care variaza temperatura (± 4 °C) si coeficientul de expansiune al apei de $2,1 \times 10^{-4}$ °C.

$U_{\text{temp}} = 18 * (\pm 4 \text{ °C}) * 2,1 * 10^{-4} = 0,00151$.
Incertitudinea rezultata privind distributia rectangulara a temperaturii: $0,00151 / \sqrt{6} = 0,0061$

$$U_v = \sqrt{0,0122^2 + 0,0061^2} = \\ \sqrt{0,00014 + 0,000037} = \\ \sqrt{0,00031} = 0,0133 \text{ ml}$$

Valoarea relativizata: $U_v/V = 0,0133/18 = 0,00073$

La cintarirea substantelor s-a folosit o balanta care are mentionat in certificatul de etalonare o valoare de abatere de $\pm 0,10$ mg.

Incertitudinea asociata etalonarii balantei este:

$$U_{\text{cintarire}} = 0,10 / \sqrt{3} = 0,0578 \text{ mg.}$$

Aceasta valoare se ia in calcul de doua ori (tara si cantarirea propriu zisa).

$$U_{\text{cintarire}} = \sqrt{2 * 0,0578^2} = 0,0817$$

Valoarea relativizata: $U_{\text{cintarire}} / V = 0,0817 / 3000 = 0,00002$

Incertitudinea compusă devine:

$$U_c = \sqrt{0,1^2 + 0,071^2 + 0,0007^2 + 0,0023^2 + 0,0029^2 + 0,0035^2 + 0,00073^2 + 0,00002^2} = 0,125$$

= 12.5 %

Și incertitudinea extinsă este:

$U_{\text{extinsă}} = k \times U_c$, unde pentru $k = 2$ exista un nivel de încredere a rezultatelor de 95%.

$$U_{\text{extinsă}} = 2 \times 12.5 \% = 25\%$$

Incertitudinea extinsa = 25%

Deci, valoarea concentrației de proteina a probei de maleina testate, cu incertitudinea extinsa, asociata este de: **1,82 ± 0,45** sau incertitudinea este **±25%** (3, 7, 8, 9).

3. Concluzii

- Determinarea proteinei din Maleina PPD, măsurată ca azot din molecula proteica, aplicând metoda Kjeldahl (determinarea azotului prin digestie cu acid sulfuric) este o metodă analitică adecvată, reproductibilă și îndeplinește cerințele de calitate ale reagentului de diagnostic.
- Testul este considerat valid, rezultatele obținute pentru fiecare parametru de validare se încadrează în criteriile de admisibilitate (9).

Bibliografie

1. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals -OIE
2. European Pharmacopoeia Monographs, 8th Edition.
3. Wikipedia Kjeldahl method
4. www.velp.com Service & support Kjeldahl
5. www.velp.com Kjeldahl Distillation Units
6. **Katriona S** - An Introduction to Nitrogen Analyzers - Environmental Monitoring, Protein Determination, and Quality Control (<http://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/160244-Environmental-Monitoring-Protein-Determination-and-Quality-Control-An-Introduction-to-Nitrogen-Analyzers/>)
7. <http://www.lesoshoppe.com/malaysia/promo/Velp%20Kjeldahl%20Nitrogen%20&%20Protein%20Analysis.pdf>

8. **Nadeem S. Raja**, MBBS, MSc, FRCPath - *Antimicrobe - Burkholderia pseudomallei* (Meliodosis) and *B. mallei* (Glanders).
9. Cerințele SR EN ISO/CEI 17025. Metode de încercare și validarea metodei.