

Valoración de endotoxinas bacterianas en el inyectable ácido zoledrónico mediante la prueba de lisado del amebocito de *Limulus*

Assessment of bacterial endotoxins in Zoledronic acid injectable drug by using *Limulus* amoebocyte lysate test

MSc. Nancy Burguet Lago, I MSc. María Isabel Reyes Tur, I MSc. Lázaro C. Brito Godoy, II MSc. Yenilen Troche Concepción I

I Laboratorios Liorad. La Habana, Cuba.

II Hospital Luisa C. de Gandulfo. Municipio Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Objetivo: valorar las endotoxinas bacterianas por la técnica del lisado del amebocito de *Limulus* para el producto inyectable ácido zoledrónico, por el método de gelificación.

Métodos: el ensayo se realizó mediante dos pruebas: 1) confirmación de la sensibilidad del lisado etiquetado, para lo cual se preparó una curva estándar con diluciones seriadas dobles de endotoxina por cuadruplicado; y 2) el ensayo del producto de inhibición, en el que se prepararon diluciones seriadas dobles de endotoxina con agua apirogénica y con las muestras de los lotes a ensayar sin sobrepasar la máxima dilución válida. Se determinó el punto final y se calculó la media geométrica. Se definió la dilución de trabajo, la cual se validó por cuadruplicado en tres lotes consecutivos.

Resultados: la sensibilidad del lisado resultó 0,03125 UE/mL. La máxima dilución válida fue de 112 UE/mL y la dilución de trabajo 1/100. La cantidad de endotoxinas bacterianas presentes en tres lotes del producto inyectable no sobrepasó el límite establecido, por lo que cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el ensayo.

Conclusión: la estandarización de las condiciones del método por gelificación, hace que este resulte eficaz, confiable, rápido y de fácil ejecución, por lo que puede emplearse como ensayo de rutina en el control de la calidad del inyectable analizado.

Palabras clave: endotoxinas bacterianas, gelificación, máxima dilución válida, lisado del amebocito de *Limulus*.

ABSTRACT

Objective: To assess the presence of bacterial endotoxins in Zoledronic Acid injectable drug by using the Limulus amoebocyte lysate test, particularly by the gelling procedure.

Methods: The assay was performed in two tests: the first was the confirmation of labeled lysate sensitivity by preparing a standard curve with serial double dilutions of endotoxins four times, and the second was the inhibition product test in which serial double dilutions of endotoxins were prepared with apyrogenic water and with samples from the batches to be tested, without exceeding the maximum valid dilution. The end point was determined and the geometric mean was calculated. Working dilution was defined and then validated four times in three consecutive batches.

Results: The lysate sensitivity was 0.03125 EU/mL. The maximum valid dilution and the working dilution were 112 EU/mL and 1/100 EU/mL respectively. The amount of bacterial endotoxins present in three batches of the injectable drug did not exceed the set limit, so it complied with the quality specifications for this test.

Conclusions: The standardization of the gelling method conditions makes it possible to state that this method is effective, reliable, quick and easy-to-perform, so it can be used as a regular test in the quality control of the analyzed parenteral drug.

Key words: Bacterial endotoxins, gelling, maximum valid dilution, Limulus amoebocyte lysate.

INTRODUCCIÓN

El ácido zoledrónico pertenece a una clase de medicamentos llamados bisfosfonatos. Actúa enlenteciendo la degradación del hueso, aumentando la densidad (grosor) de estos y disminuyendo la cantidad de calcio que los huesos liberan en la sangre.

En la actualidad, la calidad, inocuidad y seguridad de los productos farmacéuticos inyectables es de relevante importancia por su amplia formulación en la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades.¹ El ambiente de los laboratorios, el personal, los implementos y equipos de trabajo, así como el agua y las materias primas, albergan microorganismos que se desarrollan y afectan la calidad de los medicamentos parenterales.² Un contaminante propio de origen bacteriano en estos medicamentos son las denominadas endotoxinas, provenientes de las bacterias gramnegativas. Estas endotoxinas producen consecuencias en el organismo y en algunos casos pueden causar la muerte convirtiéndose en un peligro para el hombre.³

Las farmacopeas exigen dentro de sus monografías para productos inyectables la aplicación del método del lisado de amebocitos de Limulus (LAL) para la determinación de pirógenos, que son sustancias que administradas por vía parenteral y en dependencia de la dosis son capaces de provocar una respuesta febril, shock y muerte.^{4,5}

La historia del descubrimiento del reactivo LAL comienza en 1956 cuando el doctor Frederick Bang informa la muerte por coagulación intravascular en el cangrejo herradura americano, *Limulus polyphemus*, fósil viviente que habita nuestro planeta desde hace 445 millones de años (antes incluso que los dinosaurios). Desde que en la década de los 50 unos científicos descubrieron que la sangre de color azul del cangrejo herradura se coagulaba en contacto con la bacteria *Escherichia coli* y *Salmonella*, las investigaciones no han parado.⁶ Uno de estos últimos estudios se ha centrado en un péptido de los cangrejos que inhibe la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana.^{7,8}

Métodos del LAL

Existen tres variaciones básicas del ensayo del LAL en el mercado: método de gelificación (Gel-CLOT), turbidimétricos y cromogénicos.⁹ La correlación entre los métodos se basa en comparar la menor dilución de un producto dado en el cual se elimina la interferencia.^{10,11} Uno de los aspectos críticos es la validación del ensayo, con lo cual se garantiza, independientemente del método o lote, que en una dilución determinada del producto no existan interferencias y, por lo tanto, sea confiable la cuantificación de endotoxinas en dicha muestra; se debe puntualizar que lo que se valida es la muestra o su dilución y no se realizan ensayos de linealidad, exactitud o precisión como se describe para la mayoría de los métodos analíticos.¹²⁻¹⁶

Detección de endotoxinas mediante el ensayo del LAL

Las endotoxinas debido a su alta resistencia a la destrucción térmica y química sobreviven a los métodos ordinarios de esterilización.¹⁷ Se caracterizan por su potente actividad biológica, por lo que son capaces de producir cambios fisiológicos cuando son administradas por vía parenteral.¹⁸ Una dosis de 1-10 ng/kg de endotoxinas, puede provocar una respuesta febril en el hombre.¹⁹

Cooper refiere algunas ventajas del método como su simplicidad, requiere menos tiempo y volumen de muestra; y es un método de cuantificación.^{20,21} Otros autores como Mascoli y Wary de igual modo reconocen el potencial del ensayo del LAL para la industria farmacéutica.² La Associates of Cape Cod Inc. (ACC) definió el procedimiento a seguir para realizar este método de manera rutinaria.²²

Este trabajo tiene como objetivo valorar las endotoxinas bacterianas en el producto terminado ácido zoledrónico utilizando el método de gelificación.

MÉTODOS

Es importante tener en cuenta que para realizar una prueba de LAL todo el material de vidrio debe ser apirógeno y la preparación de las muestras se debe hacer asépticamente para evitar la contaminación. Se añade una cantidad de 800 µL de hidróxido de sodio (NaOH 0,1 N) para realizar el ajuste del pH en un rango de 6 a 8.²²

Estandarización del método LAL

Calificación del operario. Se preparan muestras que contengan concentraciones conocidas de endotoxinas mediante diluciones a partir de 10 UE/mL del control estándar de endotoxina (CSE) para que la concentración sea 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 UE/mL. Se adiciona el reactivo del LAL. Se realiza el análisis por cuadruplicado a cada dilución. Se colocan en un baño serológico a 37 °C por 1 h. Completado el tiempo se realizan las lecturas, se establece desviación estándar y promedio geométrico. Un resultado positivo es definido como la formación de un gel firme capaz de mantener su integridad cuando el tubo es invertido 180 °, y un resultado negativo se caracteriza por la ausencia total de un gel o la formación de un gel viscoso el cual no mantiene su integridad cuando es invertido.

A los lotes de ácido zoledrónico usado para el desarrollo de este trabajo se les realizó medición del pH considerando que debía estar en un intervalo de 6,0-8,0. Se reconstituyó el CSE 500 ng/vial E. coli O113: H10 de ACC, con 5 mL de agua reactivo LAL de Inc. que contenía menos de 0,001 EU/mL para obtener 500 ng/5mL. La potencia de 10 UE/ng se obtiene del certificado de análisis y la sensibilidad del lisado de 0,03125 UE/mL aparece en el frasco. Se reconstituyó agregando 5,0 mL de agua reactivo LAL y se mezcló suavemente hasta su disolución completa (aproximadamente 3 min).²²

Ensayo del rotulo del producto y validación del operario

Se realizó una curva estándar para la validación del rotulo del reactivo LAL y del operario-analista, para lo cual se colocaron en una gradilla 6 tubos. Excepto el primer tubo a todos se les agregó 100 µL de agua reactivo LAL. Al último tubo se le considera control negativo.

Al segundo tubo se le añade 100 µL de 0,0625 UE/mL (2I); al tercer tubo que contenía 100 µL de agua reactivo LAL se le añade 100 µL de 0,0625 UE/mL realizando diluciones seriadas hasta el quinto tubo, obteniendo una curva de 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 UE/mL.

Se añadió 100 µL de reactivo LAL que debe ser depositado en todos los tubos en un periodo de no más de 2 min. Se agitó la gradilla con los tubos por 20 a 30 s y se colocó en baño termorregulado sin circulación a 37 ± 1 °C durante 60 ± 2 min. La sensibilidad del reactivo LAL debe ser confirmada más/menos un tubo a partir de I. El control negativo debe ser negativo.¹¹

Caracterización del producto

Se calculó la máxima dilución válida (MDV) que es la relación entre el límite de endotoxina definido por la USP, 30 y la sensibilidad del reactivo LAL utilizado:

$$\text{Máxima Dilución Válida} = \frac{\text{Límite de endotoxina}}{\text{Sensibilidad del LAL}}$$

$$\text{MDV} = \frac{3,50 \text{ UE/mL}}{0,03125 \text{ UE/mL}} = 112 \quad 1/112$$

Ensayos preliminares

Se determinó la concentración de endotoxinas que tiene el producto, para lo cual se hicieron diluciones seriadas del producto hasta 1:112 (MDV) de la muestra en, agua reactivo LAL, y diluciones con estándar de endotoxinas las que deben coagular. Si esto no ocurre la muestra estaría inhibiendo la reacción de gelificación. Se añadió 100 µL de reactivo LAL y se procedió de igual forma que para la curva estándar.13

Validación

La validación debe llevarse a cabo en la dilución elegida en la prueba preliminar; debe de tenerse en cuenta que la MDV 1:112 no debe de ser superada; se definió validar la dilución 1/100 que se encuentra en el rango permitido y posibilita mayor facilidad a la hora de hacer el ensayo, el cual debe de realizarse por cuadruplicado y en tres lotes según las indicaciones de la farmacopea.

El esquema seguido fue la preparación de dos diluciones del producto: la dilución con la que se realizaría la validación 1/100 y otra con el doble de la concentración final deseada: 1/50.10

Se realizaron por duplicado dos series de estándares diluidos en agua LAL, y por cuadruplicado estándares diluidos en muestra. En ambas series se incluyeron controles negativos que contenían 100 µL de agua apirogénica. Se procedió de la misma manera que para la curva estándar.14-16

Ensayo de rutina

Se determinó la concentración de endotoxinas a los lotes del producto ácido zoledrónico, para lo cual se realizó por duplicado la dilución que fue estandarizada 1:100; se colocaron 6 tubos en una gradilla: se marcaron 2 tubos con el nombre del producto, 2 tubos como control (+) y 2 tubos como control (-). A los 2 primeros se colocaron 100 µL del producto diluido según la dilución de trabajo, en los tubos control (+) 100 µL de producto diluido + 10 µL de endotoxina y en los tubos control (-) 100 µL de agua apirogénica. Se añadió 100 µL de reactivo LAL y se procedió de igual forma que para la curva estándar y el ensayo preliminar.

RESULTADOS

El pH de las muestras concentradas (1:1) de los lotes del producto a analizar mostraron valores en un rango entre 1,8-2,0; una vez ajustado el pH se obtuvo un valor de 6,5.

Ensayo del rotulo del producto y validación del operario. Los resultados de la curva estándar se muestran en la tabla 1, en la que se confirmó la sensibilidad del LAL (0,03125 UE/mL) y la validación del operario-analista; los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

Caracterización del producto. La MDV para este producto fue 1:112, en la que se puede determinar el límite de endotoxina de la muestra.

Ensayos preliminares. La dilución 1:100 resultó ser la de trabajo a emplear en los ensayos de rutina (tabla 2).

Validación. Los resultados de la validación se muestran en las tablas 3, 4 y 5.

Ensayo de rutina. Se define 3,1 UE/mL como el mínimo valor detectable de endotoxinas para el producto.

Tabla 1. Resultados del ensayo del rótulo

Réplicas	0,5 UE/mL	0,25 UE/mL	0,125 UE/mL	0,0625 UE/mL	0,03125 UE/mL	Control negativo	Punto final
1	+	+	-	-	-	-	0,25
2	+	+	-	-	-	-	0,25
3	+	+	-	-	-	-	0,25
4	+	+	-	-	-	-	0,25

Tabla 2. Caracterización de las muestras. Resultados de ensayos preliminares

Endotoxinas con agua reactivo LAL	Diluciones del producto ácido zoledrónico										
	Réplicas	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/80	1/100	1/106	1/112
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endotoxinas con producto. Lote 1	Réplicas	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/80	1/100	1/106	1/112
	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	

Tabla 3. Valoración de endotoxina del primer lote de ácido zoledrónico

Réplicas	0,06 UE/mL	0,03 UE/mL	0,01 UE/mL	0,008 UE/mL	Control negativo agua (reactivo LAL)	Punto final
1	+	+	-	-	-	0,03
2	+	+	-	-	-	0,03
3	+	+	-	-	-	0,03
4	+	+	-	-	-	0,03
LAL (UE/mL)					Criterio	
Límite de sensibilidad	(0,06-0,01)	Media geométrica	0,03	Cumple		

Tabla 4. Valoración de endotoxina del segundo lote de ácido zoledrónico

Réplicas	0,06 UE/mL	0,03 UE/mL	0,01 UE/mL	0,008 UE/mL	Control negativo agua (reactivo LAL)	Punto final
1	+	+	-	-	-	0,03
2	+	+	-	-	-	0,03
3	+	-	-	-	-	0,06
4	+	+	-	-	-	0,03
LAL (UE/mL)					Criterio	
Límite de sensibilidad	(0,06-0,01)	Media geométrica	0,03	Cumple		

Tabla 5. Valoración de endotoxina del tercer lote de ácido zoledrónico

Réplicas	0,06 UE/mL	0,03 UE/mL	0,01 UE/mL	0,008 UE/mL	Control negativo agua (reactivo LAL)	Punto final
1	+	+	-	-	-	0,03
2	+	+	-	-	-	0,03
3	+	+	-	-	-	0,03
4	+	+	-	-	-	0,03
LAL (UE/mL)					Criterio	
Límite de sensibilidad	(0,06-0,01)	Media geométrica	0,03	Cumple		

DISCUSIÓN

El ajuste del pH es fundamental como parte del ensayo ya que los valores obtenidos en el rango 1,8-2,0 al estar por debajo del establecido (6-8), ocasionan interferencia con los resultados al afectar la formación del coágulo.^{2,6,20}

La información obtenida a través de la curva estándar confirma la sensibilidad del reactivo LAL y se comprueba también la destreza del analista; esto se verificó mediante los resultados de los puntos finales (última concentración en la que se presentó la formación del gel dentro del rango permitido).^{5,17}

Las diluciones en agua libre de pirógenos muestran que el producto no presenta contaminación por endotoxinas, ni realce de la reacción en ninguna dilución. En cuanto a las diluciones en que la muestra está marcada con endotoxina, el producto evidencia una inhibición total de la reacción hasta la dilución 1:16; a partir de 1:32 hasta la MDV 1:112 muestra resultados positivos, lo que indica que no presenta ninguna inhibición ni interferencia que afecte la prueba LAL; se eligió como dilución de trabajo 1:100.^{9,10}

Los resultados de la validación permiten plantear que el método queda validado para el producto terminado ácido zoledrónico en esa dilución de trabajo seleccionada, con un reactivo LAL de sensibilidad (0,03125UE/mL). Al no presentarse diferencias significativas entre los resultados y las especificaciones de la media geométrica, se puede plantear que estadísticamente el método es confiable.¹³

Los resultados fueron los esperados, los controles negativos para todas las pruebas fueron siempre negativos y el producto no inhibe ni realza en la dilución escogida.

La estandarización de las condiciones del método por gelificación, hace que este resulte eficaz, confiable, rápido y de fácil ejecución, por lo que puede emplearse como ensayo de rutina en el control de la calidad del inyectable analizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The United States Pharmacopeia, USP 30. The National Formulary, NF 25. Rockville: Mack Printing; 2007.

2. Mascoli CC, Wery ME. Limulus amebocyte lysate (LAL) test for detecting pyrogens in parenteral injectable products and medical devices: Advantages to manufacturers and regulatory officials. *J Parenteral Drugs Assoc.* 1979; 33(2):81-95.
3. Perdomo R. Ensayo del lisado de amebocitos del Limulus (LAL). *Rev Cubana Farm.* 2004; 38(1):8-15
4. Weary M, Pearson FA. Manufacturer's Guide to Depyrogenation. *BioPharm.* 1988 April; 25:22-9.
5. Weary ME. Understanding and setting endotoxin limits. *J Parent Sci Technol.* 1990; 44(1): 16-8.
6. Lewn J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1964; 115(1): 265-70.
7. Iwanaga, S. Primitive coagulation systems and their message to modern biology. *Thrombosis Haemostasis.* 1993; 70(1): 48-55.
8. Novitsky TJ. Discovery to commercialization: the blood of the horseshoe crabs. *Oceanus.* 1991; 27(1): 13-8.
9. Dawson ME. A wealth of options. Choosing a LAL test methods LAL Update. 1995; 13(3): 15.
10. Associates of Cape Cod Inc. Preliminary testing. LAL Update. 1996; 14(1): 1-5.
11. Dawson ME. Preliminary testing. LAL Update. 1996; 14(1): 1-5.
12. 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, Food and Drugs Administration. January, 1983.
13. Cooper JF. Validation of bacterial endotoxins test methods LAL Times. 1999; 6(2): 1-7.
14. Carrillo C, Ospina J, Aldana D, Arias J, Escheverri C. Validación de endotoxinas bacterianas en Ranitidina y Penicilina G sódica inyectables mediante la prueba de Lisado del amebocito de Limulus. *Rev. Universitas Scientiatum.* 2006; 11(1): 15-28.
15. Osorio O, Pérez X, Arias J, Rodríguez D, Fernández C. Interferencias en la validación del ensayo de Lisado de Amebocitos de Limulus para Oxitetraciclina 500 mg/mL *Rev Cubana Farm.* 2007; 41(1): 12-9.
16. Morote M. Validación de la técnica L.A.L. (GEL CLOT) en los agentes de radiodiagnóstico y radioisótopos. *Alasbimn J* [Internet]. 2002 July [citado 13 Feb 2011]; 4(16). Disponible en: http://www.alasbimnjournal.cl/revistas/16/sec_b/0,1990,SCID%253D1497,00.html

17. Weary ME. Depyrogenation. In: Pearson FC editor. Pyrogens: endotoxins, LAL testing and depyrogenation. New York: Marcel Dekker; 1985. p. 203-28.
18. Suffredini AF, O'Grady NP. Pathophysiological responses to endotoxins in humans. En: Brade, H, Opal, SM, Vogel N, Morrison DC, editors. Endotoxin in health and disease. New York: Marcel Dekker; 2000. p. 817-30.
19. Hochstein HD, Fitzgerald EA, McMahon, FG, Vargas R. Properties of US Standard (EC-5) in human male volunteers. J Endotox Res. 1994; 1:52-6.
20. Cooper JF. Principles and applications of the Limulus test for pyrogen in parenteral drugs. Bull Parenteral Drug Assc. 1975;29(3):122-30.
21. Cooper JF, Hochstein HD, Seligmann EB. The Limulus test for endotoxin (Pyrogen) in radiopharmaceutical and biological. Bull Parenter Drug Assoc. 1972;26(4):153-62.
22. Associates of Cape Cod Inc. Routine testing and retest. LAL Update. 1997;15(2):1-4.

Recibido: 30 de febrero de 2012.

Aprobado: 23 de mayo de 2012.

Nancy Burguet Lago. Laboratorios Liorad. Ave. 27 A No. 26402 e/ 264 y 268. San Agustín, La Lisa. La Habana, Cuba. Correo electrónico: nburguet@liorad.quimefa.cu