

Validación del método de formación de coágulo para la determinación de endotoxinas bacterianas en inmunoglobulinas (IgG) nacionales

Method validation clot formation for determining bacterial endotoxins national immunoglobulin (IgG)

DOLLY E MONTAÑO E¹, MOISÉS G ALVARADO R¹, MARITZA J BURGOS Q¹.

RESUMEN

Las endotoxinas bacterianas son lipopolisacáridos (LPS) localizados exclusivamente en la membrana externa de las bacterias gramnegativas, su ingreso al organismo a través de productos parenterales puede causar fiebre, taquicardia, aumento de presión sanguínea y en algunos casos ocasiona la muerte. Existen normativas internacionales acerca del límite de endotoxina para productos farmacéuticos inyectables, tal como las inmunoglobulinas (IgG), que pueden estar expuestas a contaminación durante el proceso de producción y por lo tanto es necesario realizar pruebas para la determinación de endotoxinas bacterianas. El método del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) es una de ellas. Este método se fundamenta en la reacción del LAL, el cual es un extracto de células sanguíneas que interactúan con endotoxinas, activando la cascada del proceso de coagulación y originando la formación de la coagulina. En diversas ocasiones algunas proteínas intervienen en la activación o desactivación de esta cascada, bien sea potenciando o inhibiendo la formación del coágulo. En el caso de la potenciación, el calentamiento es uno de los métodos recomendados por la farmacopea estadounidense (USP) para eliminar interferencias, puesto que desnaturaliza las proteínas que causan la potenciación sin pérdida de endotoxinas. En este trabajo se validó la determinación de endotoxinas bacterianas en IgG mediante el método LAL, el cual es un método rápido y de fácil ejecución, por lo que puede implementarse como ensayo de rutina en control de calidad y por ende nos permite agilizar las liberaciones de lotes de estos productos.

Palabras claves: Endotoxinas bacterianas, Lisado de amebocito de limulus (LAL), Inmunoglobulina G (IgG), lipopolisacáridos, Potenciación de la reacción, Interferencia en la reacción

ABSTRACT

Bacterial endotoxins are lipopolysaccharides (LPS) located exclusively in the outer membrane of gram-negative bacteria, their entry into the body through parenteral products can cause fever, tachycardia, increased blood pressure and in some cases cause death. There are international standards for endotoxin limit for injectable pharmaceuticals, such as immunoglobulins (IgG), which may be exposed to contamination during the production process and therefore it is necessary to test for determination of bacterial endotoxins. The method of the *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) is one of them.

This method is based on the LAL reaction, which is an extract of blood cells which interact with endotoxin, triggering the cascade of the coagulation process and causing the formation of coagulin. On several occasions some proteins involved in the activation or deactivation of this waterfall, either by enhancing or inhibiting clot formation. In the case of empowerment, the warming is one of those recommended by the US Pharmacopoeia (USP) to eliminate interference, since denatures proteins that cause endotoxin enhancement lossless methods. In this paper the determination of bacterial endotoxins in IgG was standardized by the LAL method, which is quick and easy to implement method, which can be implemented as a routine test in quality control and thus allows us to streamline releases lots of these products.

Key words: Bacterial endotoxins, *Limulus* amoeboid lysate (LAL), Immunoglobulin G (IgG), Lipopolysaccharides, Reaction potentiation, Interference in reaction.

1 Departamento de Control de Hemoderivados y Afines, División de Control Nacional de Productos Biológicos, Gerencia Sectorial de Registro y Control. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". 0212-219.17.50. Correo: maritzaquijada43@gmail.com

INTRODUCCION

Las endotoxinas bacterianas son lipopolisacáridos (LPS) localizados exclusivamente en la membrana externa de las bacterias gramnegativas; su presencia en productos farmacéuticos inyectables pueden estar asociados a problemas durante la producción, existen límites de endotoxinas establecidos para este tipo de producto ⁽¹⁾.

Las endotoxinas pueden producir fiebre, taquicardia, aumento de presión sanguínea y en algunos casos ocasionar la muerte.

El reactivo de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) es empleado en la prueba para la determinación de endotoxinas bacterianas ⁽²⁾.

En diversas ocasiones algunas proteínas intervienen en la activación o desactivación de la cascada de coagulación, bien sea potenciando o inhibiendo la formación del coágulo.

El calentamiento es uno de los métodos recomendados por la farmacopea estadounidense (USP) para eliminar interferencias, puesto que desnaturaliza las proteínas responsables de la potenciación sin pérdida de endotoxinas ⁽³⁾.

OBJETIVO GENERAL:

Validar la determinación de endotoxinas bacterianas en Inmunoglobulinas (IgG) de producción nacional mediante el método LAL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Para el ensayo LAL se emplea muestras de Inmunoglobulinas intravenosas (IgG) de un mismo fabricante.

Agua grado reactivo LAL (LRW), Associates of Cape Cod Inc.

Control Estándar Endotoxina (CSE) 0.5 µg/vial y 125 µg/vial, Associates of Cape Cod Inc.

Lisado de amebocitos de Limulus (LAL) Pyrotell® λ=0.06 UE/mL, Associates of Cape Cod Inc.

Materiales

Tubos de reacción de soda lime Pyrotube®-S, Associates of Cape Cod Inc., apirogénicos.

Tubos de dilución de Borosilicato Pyrotube – D®, Associates of Cape Cod Inc., apirogénicos.

Bloque de calentamiento verificado a 37 ± 1 ° C.

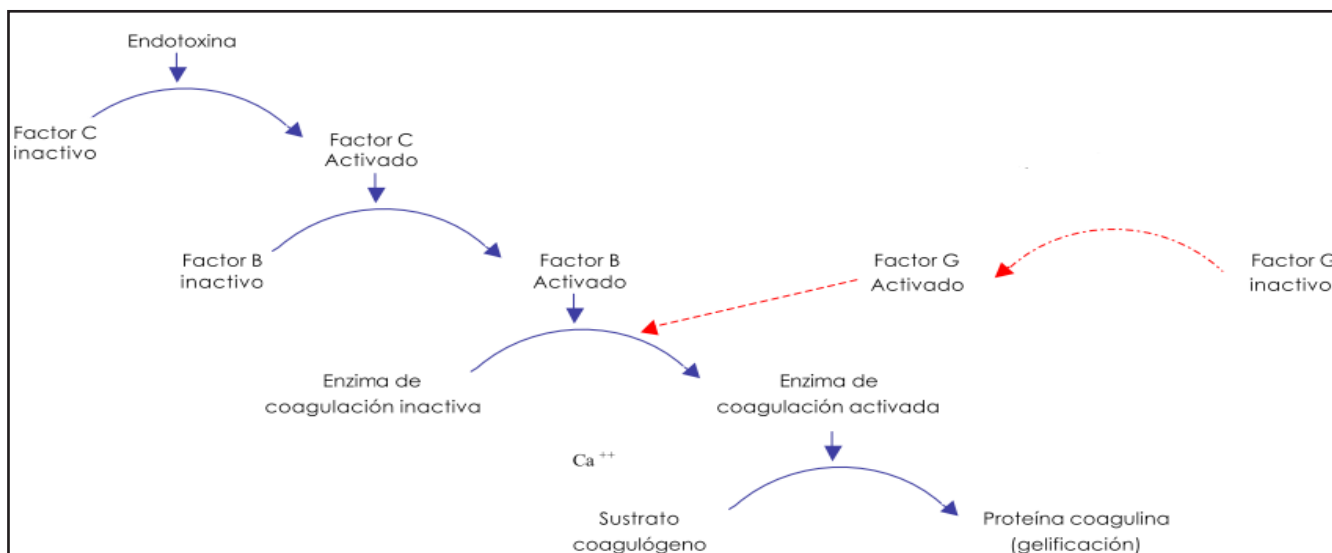


Figura 1.- Cascada de Coagulación.
Fuente: Manual Midas Consultores SRL (1.997)

Método

Se verificó la Sensibilidad del Reactivo Lisado de Amebocitos del *Limulus polyphemus* (Figura 2)

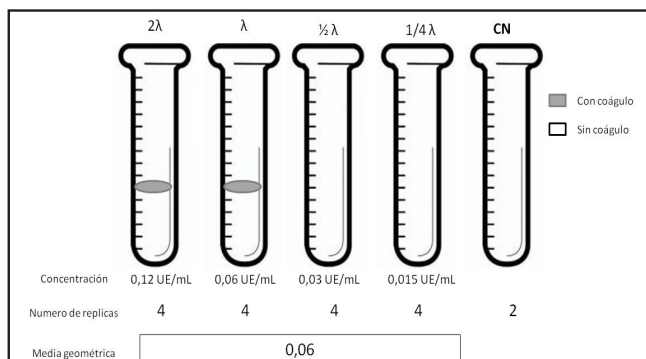


Figura 2.- Confirmación de la sensibilidad del reactivo LAL

Fuente: Elaboración propia

Se determinó la Máxima Dilución Válida (MDV) del producto

$$MDV = \frac{0,91 UE/mL}{0,06 UE/mL} = 15,1666$$

Luego se determinó el conjunto de diluciones a utilizar para las pruebas preliminares. Para ello, se eligieron diluciones intermedias hasta alcanzar la máxima dilución válida (MDV). (Figura 3).

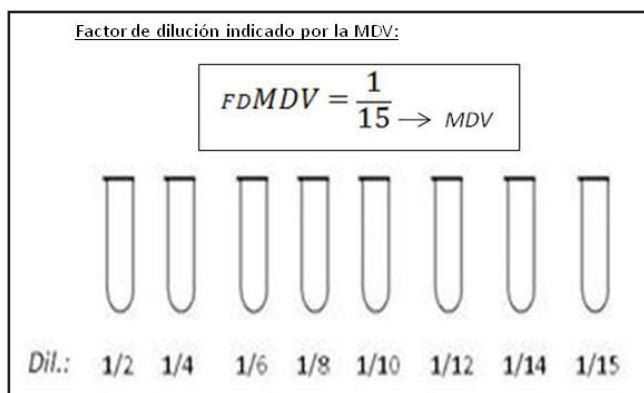


Figura 3.- Conjunto de diluciones preliminares.

Fuente: Elaboración propia

Se caracterizó la muestra a ser evaluada, tal como lo indica la Tabla 1. La solución A comprende las diluciones a ser evaluadas, para las cuales se debe diluir la muestra con agua grado reactivo LAL como se

observa en la Tabla 2. La solución B comprende las diluciones primarias a la que se agrega una concentración conocida de endotoxinas (2λ), partiendo de 10 UE/mL tal como se observa en la Tabla 3. La solución C se preparó para verificar la sensibilidad del reactivo Lisado de Amebocitos del *Limulus polyphemus* (LAL) a fin de constatar su efectividad; para ello se empleó el control estándar de endotoxina que declara 125 μg/vial y previamente reconstituido de acuerdo al certificado del proveedor.

Tabla 1. Caracterización de la inmunoglobulina (IgG).

Solución	Ítem bajo ensayo	Factor de Dilución de la muestra	Concentración de endotoxina UE/mL	Número de repeticiones
A	Diluciones de la muestra, sin spike	1:2	-	3 c/u
		1:4		
		1:6		
		1:8		
		1:10		
		1:12		
		1:14		
		1:15		
B	Diluciones de las muestra, con spike	1:2	2λ	3 c/u
		1:4		
		1:6		
		1:8		
		1:10		
		1:12		
		1:14		
		1:15		
C	Confirmación de la sensibilidad del LAL empleado	-	2λ	2 c/u
			1λ	
			0.5λ	
			0.25λ	
D	Control negativo (Agua LRW)	-	-	2 c/u

UE/mL: unidades de endotoxinas por mililitro; con spike: con endotoxina; sin spike: sin endotoxina. Fuente: Elaboración propia

Tabla 2. Preparación de las diluciones sin spike.

Diluciones menores que MDV	Dilución a evaluar	Volumen de inmunoglobulina o de la dilución previa (µL)	Volumen de agua LRW (µL)	Volumen final de la dilución (µL)
	1:2	1000 de la muestra	1000	2000
	1:4	500 de la muestra	1500	2000
	1:6	333 de la muestra	1667	2000
	1:8	250 de la muestra	1750	2000
	1:10	200 de la muestra	1800	2000
	1:12	167 de la muestra	1833	2000
	1:14	143 de la muestra	1857	2000
MDV	1:15	133 de la muestra	1867	2000

MDV: máxima dilución válida; Agua LRW: agua calidad inyectable
Fuente: Elaboración propia

Tabla 3. Preparación de las diluciones primarias con spike.

Diluciones menores que MDV	Dilución a evaluar	Volumen de la dilución correspondiente de la muestra sin endotoxina. (µL)	Volumen de dilución de endotoxina de 10 UE/mL.	Volumen final de la dilución (µL)
	1:2 + spike	988 de la dilución 1:2	12	2000
	1:4+ spike	988 de la dilución 1:4	12	2000
	1:6+ spike	988 de la dilución 1:6	12	2000
	1:8+ spike	988 de la dilución 1:8	12	2000
	1:10+ spike	988 de la dilución 1:10	12	2000
	1:12+ spike	988 de la dilución 1:12	12	2000
	1:14+ spike	988 de la dilución 1:14	12	2000
MDV	1:15+ spike	988 de la dilución 1:15	12	2000

MDV: máxima dilución válida
Fuente: Elaboración propia

Esta caracterización nos permitió conocer el comportamiento de la muestra y evidenciar posibles interferencias de la reacción de coagulación para su posterior eliminación. La solución D es el control negativo, este indica que el diluyente empleado no contiene endotoxinas u otra sustancia que interfiera con la reacción de coagulación.

Para esta solución se empleó únicamente agua grado reactivo LAL

Se observó potenciación en la reacción de coagulación (interferencia), por lo que se aplicó calentamiento en baño de termostático a una temperatura de 99°C±1°C durante 3 minutos. Este proceso permite desnaturalizar las proteínas presentes en la muestra y con ello se logra inactivar las proteínas que posiblemente interfieren en la reacción. Sin embargo, es necesario garantizar que el proceso de calentamiento no interfiere en la determinación de endotoxinas, por lo tanto se estandarizó el tiempo del mismo.

Se agregó 1 ml de endotoxina estándar con una concentración conocida (2λ) en 4 tubos de ensayo diferentes, y se sometió a diferentes tiempos de calentamiento como se indica en la tabla 4.

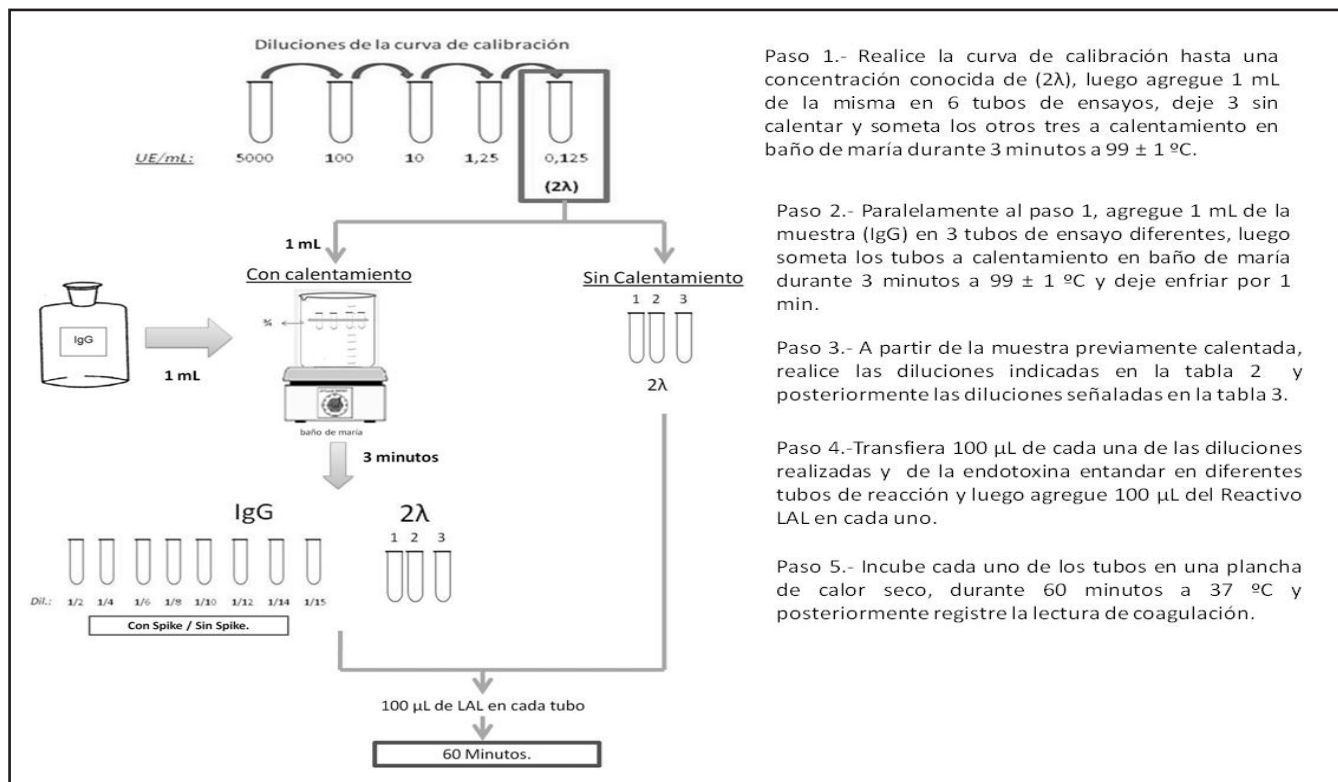
Tabla 4.- Estandarización del tiempo de calentamiento.

Réplicas	Sin calentamiento	2 min. de calentamiento	3 min. de calentamiento	4 min. de calentamiento	CN
1	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
2	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
3	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

CN: control negativo; min: minutos
Fuente: Elaboración propia:

Este proceso permitió determinar un tiempo adecuado de calentamiento para inhibir la interferencia sin eliminar endotoxinas, es por ello que se debe elegir el tiempo intermedio entre el primer tiempo de coagulación y el último. En este caso, para todos los tiempos de calentamiento se observó coagulación, por lo tanto se eligió 3 minutos para las posteriores pruebas preliminares.

Luego de establecer las condiciones específicas de calentamiento se realizó el mismo proceso, pero con la muestra en análisis, para ello se siguió las indicaciones enunciadas en la Figura 4.



Paso 1.- Realice la curva de calibración hasta una concentración conocida de (2λ), luego agregue 1 mL de la misma en 6 tubos de ensayos, deje 3 sin calentar y someta los otros tres a calentamiento en baño de maría durante 3 minutos a 99 ± 1 °C.

Paso 2.- Paralelamente al paso 1, agregue 1 mL de la muestra (IgG) en 3 tubos de ensayo diferentes, luego someta los tubos a calentamiento en baño de maría durante 3 minutos a 99 ± 1 °C y deje enfriar por 1 min.

Paso 3.- A partir de la muestra previamente calentada, realice las diluciones indicadas en la tabla 2 y posteriormente las diluciones señaladas en la tabla 3.

Paso 4.-Transfiera 100 µL de cada una de las diluciones realizadas y de la endotoxina estándar en diferentes tubos de reacción y luego agregue 100 µL del Reactivo LAL en cada uno.

Paso 5.- Incube cada uno de los tubos en una plancha de calor seco, durante 60 minutos a 37 °C y posteriormente registre la lectura de coagulación.

Figura 4. Diluciones Preliminares con calentamiento

Fuente: Elaboración propia

En cada ensayo se realizó un control positivo para monitorear si el procedimiento se ha efectuado correctamente.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó la dilución más apropiada para realizar las pruebas de interferencia; la cual debe estar libre de endotoxinas.

Prueba de Interferencia (potenciación): se realizó para verificar si la solución de trabajo elegida logra eliminar por completo la interferencia ocasionada por la muestra. Esta prueba se realizó en 3 lotes diferentes de inmunoglobulina y por triplicado. Tabla 5.

Tabla 5. Prueba de interferencia.

Solución A	Concentración de Endotoxina/ Solución a la que se agrega la endotoxina	Diluyente	Concentración inicial de la endotoxina UE/ mL	Número de repeticiones
A	Ninguna/ dilución 1:12 de la inmunoglobulina	Agua reactivo para LAL	—	3 c/u
B	2λ dilución 1:12 de la inmunoglobulina	dilución 1:12 de la inmunoglobulina	2λ λ ½ λ ¼ λ	3 c/u
C	2λ Agua reactivo para LAL	Agua reactivo para LAL	2λ λ ½ λ ¼ λ	2 c/u
D	Ninguna/ Agua reactivo para LAL	—	—	2 c/u

LAL: lisado de amebocito de limulus

Fuente: Elaboración propia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente se confirmó la sensibilidad del lote empleado de reactivo LAL (Figura 2) y se comprobó que no hay variación en la sensibilidad declarada del mismo, por lo que los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos por normativas internacionales para productos farmacéuticos inyectables.

Además se calculó la Máxima dilución válida (MDV) (1:15), que es la máxima dilución permitida en la que se puede determinar el límite de endotoxinas de IgG.

$$MDV = \frac{0,91UE/mL}{0.06 UE/mL} = 15,1666$$

En este trabajo se estandarizó el tiempo de calentamiento de la muestra de IgG, de tal manera que pudiéramos eliminar la interferencia sin que ello implicara la pérdida de endotoxinas. Para ello, se calentó en baño de maría una concentración estándar de endotoxinas (2λ) y se sometió a diferentes tiempos de calentamiento (Tabla 6). De los resultados obtenidos, se pudo apreciar que para 1 mL ((2λ) de endotoxina el proceso de coagulación se mantiene, incluso hasta los 4 minutos de calentamiento.

Tabla 6.- Resultados de calentamiento de la endotoxina estándar

Replicas	Sin calentamiento	2 min.	3 min.	4 min.	CN
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-

CN: control negativo

Previo al proceso de calentamiento se caracterizaron diferentes lotes de inmunoglobulina, en donde se observó una considerable potenciación de la reacción LAL (Tabla 7). No obstante, luego de someter los mismos lotes a 3 minutos de calentamiento en baño

de maría (Tabla 8), se pudo apreciar disminución de la interferencia a partir de la dilución 1:12. Esta última dilución es menor a la MDV y además no contiene endotoxinas detectables, por lo tanto, presenta todas las características necesarias para ser elegida como dilución de trabajo rutinaria.

Tabla 7- Caracterización de la muestra mediante pruebas preliminares.

Ensayos	Replicas	1:2	1:4	1:6	1:10	1:12	1:14	1:15	CN
SIN SPIKE	1	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-
CON SPIKE	1	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-

CN: control negativo

Tabla 8.- Caracterización de la muestra mediante pruebas preliminares, después del calentamiento.

Ensayos	Replicas	1:2	1:4	1:6	1:10	1:12	1:14	1:15	CN
SIN SPIKE	1	+	+	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-
CON SPIKE	1	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-

Fuente: Elaboración propia

Luego de establecer 1:12 como la dilución de trabajo, se realizaron pruebas de factores de interferencia en tres lotes diferentes de inmunoglobulina; de los cuales todos obtuvieron valores de media geométrica entre las diluciones (2λ) y (λ) (Tabla 9), lo que indica que efectivamente el proceso de calentamiento logró eliminar la interferencia producida en la cascada de señalización, probablemente, debido a la presencia de algunas proteínas que producen potenciación de la reacción LAL.

Tabla 9. Prueba de la validación en Inmunoglobulina de diferentes lotes

Réplicas	LOTE 1			Lote 2			Lote 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2λ (0,12 UE/mL)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1λ (0,06 UE/mL)	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1/2λ (0,03 UE/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/4λ (0,015UE/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Punto Final	0,06	0,06	0,06	0,12	0,12	0,12	0,06	0,06	0,06
Media Geométrica	0,06			0,12			0,06		
Desviación Estándar	0,06								

UE/mL: unidades de endotoxinas por mililitros

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos de la validación del método, nos permite plantear esta técnica para las inmunoglobulinas intravenosas de producción nacional, en las cuales prevalece una interferencia que afecta la lectura final de la prueba.

El calentamiento durante 3 minutos $99^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño de termostático es suficiente para desnaturalizar las proteínas presentes en la muestra y por ende eliminar la potenciación de la reacción LAL, lo que nos permite confirmar que el método de la formación del coágulo con previa eliminación del factor interferente, queda validado para las Inmunoglobulinas (IgG).

La técnica aplicada es sencilla, rápida y eficaz, por lo que puede implementarse en los Laboratorios de la División de Control Nacional de Productos Biológicos, como ensayos de rutina para el control de calidad de las inmunoglobulinas de producción nacional, que son sometidas a liberación lote a lote; y por ende agilizar la puesta en el mercado de los lotes del producto por parte de la Autoridad Nacional Reguladora.

Por otra parte, implementar una técnica *in vitro*, que sustituya técnicas aplicadas en animales de experimentación, las cuales son pruebas largas y laboriosas es una tendencia a nivel mundial, actualmente esta es la recomendación en las principales farmacopeas y órganos internacionales que regulan el control de calidad de los medicamentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. FDA. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxins test for human and animal parenteral drugs, biological products and medical devices. Food and Drug Administration. December, 1987. Pág. 11- 18.
2. USP 38 – NF 33. Pruebas Biológicas / «85» Prueba de Endotoxinas Bacterianas. Pág. 164 – 168. 2015.
3. Formación Continuada para Farmacéuticos de Hospital (4.3). Hemoderivados (I): Inmunoglobulinas. Carlota Bernal; Ramón Joda, Bruno Monturo. Barcelona, España: Fundación Promedic. Pág. 68-76.
4. Fernandez Jorge, Padron Jorge A., Carballosa Laritza, Lisette Luis, Limra Gerardo. Eliminación de endotoxinas

presentes en la cristalería utilizada en la preparación de disoluciones parenterales por calor seco. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 2001; 32 (3).

5. ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). November 2005.
6. Pearson FC. Microbial Pyrogen. En: Pearson FC, eds. Endotoxins, LAL Testing, and Depyrogenation. New York: Marcel Dekker; 1985.
7. Desarrollo de un sistema de detección de endotoxinas basadas en la optimización e implementación de un protocolo de biofuncionalización sobre biosensor electroquímico de diseño específico. Capítulo 3.2. Las Endotoxinas. Pág. 24 – 3. Capítulo 3.5 Técnica de detección de endotoxinas. Pág. 44 – 49. 2013.
8. 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.