

Evaluación del método cromogénico cinético para la determinación de endotoxinas bacterianas en el inyectable succinilcolina infantil 100 mg.

Nancy Burguet-Lago, Aylid Suárez- Castillo*, Yamilka Herrera- Ledesma**

Laboratorios LIORAD. Ave. 27 A No. 26402 e/ 264 y 268. San Agustín. La Lisa. La Habana. Cuba. Tel. 271-78-99 Ext.126, *Laboratorio de Control Microbiológico de la Empresa "Adalberto Pesant". Tel.202-05-51 Ext.173, **Laboratorios LIORAD.Tel. 271-78-99 Ext.123 nburguet@liorad.aica.cu

Recibido: 18 marzo de 2015.

Aceptado: 23 de junio de 2015.

Palabras clave: endotoxinas bacterianas, succinilcolina infantil 100 mg, variante cromogénica cinética, máxima dilución válida.

Key words: bacteria endotoxin, infant succinylcholine 100 mg, chromogenetic kinetic variation, maximum validate dissolution.

RESUMEN. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el método de lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL) en su variante cromogénica cinética para la determinación de endotoxinas bacterianas en el inyectable succinilcolina infantil 100 mg. Esta variante monitorea el desarrollo de color a través del tiempo y emplea una curva estándar representada por el tiempo de reacción en función de la concentración conocida de endotoxinas, en un rango de 0,005 a 50 UE/mL. La calificación del analista para obtener resultados confiables fue confirmada durante la estandarización del método. Se realizó la caracterización del producto obteniéndose 1:8000 como factor de dilución al calcular la máxima dilución válida. La selección de la dilución de trabajo fue evaluada preliminarmente en el ensayo de inhibición y realce definiéndose 1:4000 como dilución óptima. La dilución elegida se validó en tres lotes consecutivos del producto y se observó en todos los casos porcentajes de recobrados enmarcados en los límites establecidos (50-200%) y el coeficiente de variación inferior al criterio de aceptación aprobado para este parámetro. Se aplicó el método a los tres lotes pilotos. A modo de conclusión podemos plantear que se demostró que la estandarización y validación del mismo permite su aplicación como ensayo de rutina para la determinación de endotoxinas bacterianas como parte del control de calidad y estudio de estabilidad de este producto.

ABSTRACT. The aim of this study was to evaluate the method of the *Limulus* amebocyte lysate (LAL) in its kinetic chromogenic variant for the determination of bacterial endotoxins in infant succinylcholine injection 100 mg. This variant do a monitoring of the color development across time and uses a standard curve plotted for the reaction time according to the known endotoxin, in the range of 0.005 to 50 EU / mL concentration. The rating analyst for reliable results was confirmed by the standardization of the method. It was carried out the characterization of the product being obtained 1:8000 as dilution factor when calculating the maximum valid dilution. The selection of the working dilution was evaluated in preliminary inhibition and enhancement testing and 1:4000 have being defined as the optimal dilution. The chosen dilution was validated in three consecutive batches of the product and the percentages observed in all cases recovered

framed in the limits (50-200%) and lower coefficient of approved acceptance criteria for this parameter variation. The method was applied to the three pilot batches. In the conclusion we can state that it was shown that this standardization and validation allow its application as a routine test for determination of bacterial endotoxins as part of the quality control and stability study of this product.

INTRODUCCIÓN

La succinilcolina está indicado como coadyuvante de la anestesia para facilitar la intubación endotraqueal y la ventilación asistida en endoscopias: laringoscopias, bronoscopias y citoscopias.¹ En Cuba la succinilcolina para uso infantil se fabricaba por la Empresa de Producción de Biológicos “Carlos J. Finlay”, en forma de polvo liofilizado (inyectable). En la actualidad este medicamento fue desarrollado en forma de solución inyectable en la Unidad Empresarial de Base (UEB) Laboratorios Liorad

En este tipo de medicamento puede aparecer como un contaminante de origen bacteriano las denominadas endotoxinas, las cuales son complejos de lipopolisacáridos de alto peso molecular que constituyen el principal componente de la pared celular de este tipo de bacterias.^{2, 3} Se caracterizan sobre todo por su potente actividad biológica, cuando son administradas por vía parenteral pueden llegar a provocar la muerte de los pacientes.⁴

Actualmente, para la aprobación y comercialización de una gran parte de los productos inyectables, las principales instituciones reguladoras nacionales e internacionales establecen la cuantificación de endotoxinas bacterianas por el método del lisado de amebocitos del *Limulus*(LAL) como monitor de pirógenos para más del 90 % de los parenterales que regula, para detectar la presencia de endotoxinas bacterianas. Esta es una técnica rápida y confiable obtenida a partir de extractos acuosos de amebocitos circulantes del cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus*).⁵

Existen tres variantes para la prueba de endotoxinas bacterianas: las técnicas de coagulación (*Gel-clot*), basada en la formación de un gel; las técnicas turbidimétricas, apoyada en la producción de turbidez después de la ruptura de uniones de un sustrato endógeno y la técnicas cromogénicas que se basa en el desarrollo de color después de la ruptura de un complejo sintético péptido-cromógeno.⁶ Al ser la succinilcolina, en solución, un producto en desarrollo se debe estandarizar un método para la determinación de endotoxinas bacterianas en este inyectable.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el método de lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL) en su variante cromogénica cinética para la determinación de endotoxinas bacterianas en el inyectable succinilcolina infantil 100 mg.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de ensayo

Las muestras utilizadas para la validación de la dilución de trabajo corresponden a los lotes a escala de laboratorio del producto en desarrollo succinilcolina infantil 100mg: Sp14001, Sp14002 y Sp14003.

Descripción de la prueba de lisado de amebocitos del *limulus* (lal), método cromogénico cinético

El método cromogénico es un ensayo cinético cuantitativo para la detección de endotoxinas bacterianas. La prueba se realizó añadiendo un volumen de reactivo LAL/Sustrato a 1 volumen de muestra, se incubó a 37°C en un equipo lector de microplacas, que viene acoplado con un software (KQCL) en el cual se introducen todos los datos de la misma y se monitorea el desarrollo de color amarillo a través del tiempo. Cuanto mayor sea la concentración de endotoxinas en la

muestra más rápidamente se producirá la p- nitroanilina (pNA), sustancia amarilla que absorbe a 405 nm y menor será el tiempo de activación.

Para determinar las concentraciones de endotoxinas de las muestras se incluyeron una serie de endotoxinas estándar (50; 5,0; 0,5; 0,05 y 0,005 UE/mL) para obtener una curva, formada por la representación gráfica del tiempo de reacción en función de la concentración conocida de endotoxinas.

La prueba incluyó: 1- muestra del producto, 2-control positivo: muestras del producto a las que se le agrega una concentración de endotoxina que corresponde al punto medio de la curva estándar (5 UE/mL) y 3-control negativo (agua apirogénica).

Preparación del reactivo LAL

Se realizaron movimientos ligeros del vial del reactivo LAL para que el polvo liofilizado adherido en las paredes del bulbo se depositará en el fondo. Se eliminó el vacío elevando el tapón cuidadosamente evitando contaminar la boca del vial.

Con ayuda de una pipeta se extrajeron 3,2 mL de buffer de reconstitución *glucashield* y se añadió al vial de reactivo que contenía el lisado de amebocitos del *Limulus*. Se homogenizó el contenido realizando movimientos circulares manuales de forma suave, para evitar la formación de espuma. Una vez reconstituido el liofilizado se cubrió el vial con *parafilm* hasta su uso.

Preparación del control de endotoxina estándar

Se reconstituyó el vial de Control Estándar de Endotoxinas (CEE) con 2 mL de agua apirogénica según el certificado de análisis del fabricante. Se homogenizó en un agitador vortex durante 1 minuto, obteniendo una concentración de 50UE/mL (mayor concentración ensayada).

Muestreo y preparación de la muestra

Se tomaron muestras correspondientes al inicio, centro y final de cada lote. Se combinó el contenido de tres bulbos de cada lote para formar una muestra homogénea en tubos eppendorf apirogénicos.

Estandarización del ensayo LAL

La estandarización del ensayo del LAL incluyó la calificación del analista y los ensayos preliminares.

La calificación del analista se realizó teniendo en cuenta la destreza del mismo para realizar la curva estándar. Se evaluaron diferentes concentraciones de un control estándar de endotoxinas por cuadruplicado con el reactivo LAL. Se partió del vial de 50 UE/mL y se realizaron diluciones seriadas en tubos eppendorf para obtener concentraciones de endotoxina, (50; 5,0; 0,5; 0,05 y 0,005 UE/mL) homogenizando entre una y otra durante 1 minuto en el mezclador vortex. Se establecieron los criterios de aceptación: coeficiente de correlación ($r \geq 0.98$) y coeficiente de variación entre las réplicas $\leq 10\%$

Los ensayos preliminares incluyeron la determinación de pH y la caracterización del producto (el cálculo de la máxima dilución válida (MDV) y el ensayo de inhibición o realce para seleccionar de la dilución de trabajo).

Para la verificación del pH de las muestras se procedió a medir el pH de cada uno de los lotes, que debían encontrarse en un rango de 6,0 a 8,0 empleando un Ph-metro. En caso de no cumplir las especificaciones las muestras o las diluciones de las mismas se procedería a ajustar con Hidróxido de Sodio (NaOH) o Ácido Clorhídrico (HCL) 1mol/L apirogénico según corresponda.

Para la caracterización del producto fue necesario conocer la Máxima Dilución Válida (MDV) que se le puede hacer a una muestra y aun detectar las endotoxinas presentes en la misma.

Para realizar el cálculo de la MDV se empleó el límite de endotoxinas reportado para el producto en estudio por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 35, 2012).⁷ Se tuvo en cuenta la sensibilidad del reactivo LAL (λ). El cálculo se realizó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{MDV} = \frac{\text{Límite de endotoxina}}{\text{Menor valor de la curva } (\lambda)}$$

Donde:

λ : 0,005 UE/mL

Límite de endotoxina de la succinilcolina infantil 100 mg reportado es: 2.0 UE/mg

Potencia del producto: 20 mg/mL o 100 mg/5mL

Límite de endotoxina de la succinilcolina infantil 100 mg expresado en UE/mL es: 40 UE/mL (límite en UE/mg X la potencia)

Para la selección de la dilución de trabajo se realizó el ensayo de interferencias (inhibición o realce) para lo cual se prepararon una serie de diluciones del producto marcadas con una concentración de endotoxinas de 4 λ (punto medio de la curva) y una serie de diluciones no marcadas (1:800, 1:1000, 1:2000, 1:4000) sin exceder la máxima dilución calculada (1/8000).

Estas diluciones se ensayaron en paralelo para determinar la concentración de endotoxinas para cada una de ellas, calculando el porcentaje de recuperación (% R) en cada caso; resulta apropiada la dilución a la cual el valor obtenido del recobro esté entre 50 y 200 % y Coeficiente de variación entre las réplicas $\leq 10\%$.

Validación de la dilución de trabajo

La validación de la dilución de trabajo se realizó según lo establecido por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA).⁸ Se emplearon 3 lotes (a escala de laboratorio) consecutivos del producto con la dilución seleccionada en la prueba de inhibición o realce.⁹⁻¹¹ Se realizaron por duplicado diluciones de la muestra en agua LAL (a la dilución seleccionada) y en la concentración estándar (punto medio de la curva) como control positivo. Las muestras a evaluar se mezclaron con el reactivo LAL, se colocaron en un lector de microplacas acoplado a la computadora y este automáticamente monitoreó el tiempo que demora en aparecer la coloración amarilla (tiempo de reacción), el cual es inversamente proporcional a la concentración de endotoxinas presentes en la muestra. La concentración de endotoxinas en las muestras se calculó contra la curva estándar de endotoxina.

Se establecieron los criterios de aceptación: coeficiente de correlación de la curva ($r \geq 0,98$), el % de recobrado de la muestra marcada entre 50-200, el coeficiente de variación entre las réplicas $\leq 10\%$.

Ensayo de rutina para el control de calidad

Una vez validada la dilución de trabajo para la determinación de endotoxinas bacterianas por el método LAL, quedó definida como la dilución a emplear en los ensayos para el control de la calidad de los lotes del producto terminado succinilcolina infantil 100mg, y para realizar los estudios de estabilidad del mismo.

Se empleó la dilución validada para evaluar los niveles de endotoxinas bacterianas en los tres lotes a escala piloto en tiempo cero (estudio de estabilidad). Los resultados se expresaron en UE/mg. El criterio de aceptación < 2.0 UE/mg (límite de especificación).

RESULTADOS

El ensayo de endotoxinas bacterianas se realizó por el método LAL en su variante cromogénica cinética, debido a las ventajas que presenta el mismo como son: bajo límite de detección (sensibilidad de 0,005 UE/mL) y la obtención de resultados cuantitativos de las muestras.⁶

En la guía de validación de la FDA para este método, uno de los requisitos que establece es la calificación del analista (destreza para montar la curva estándar del ensayo). La figura 1 muestra los resultados del tiempo de reacción vs control estándar de endotoxina (CEE) expresado en UE/mL (de la curva estándar).

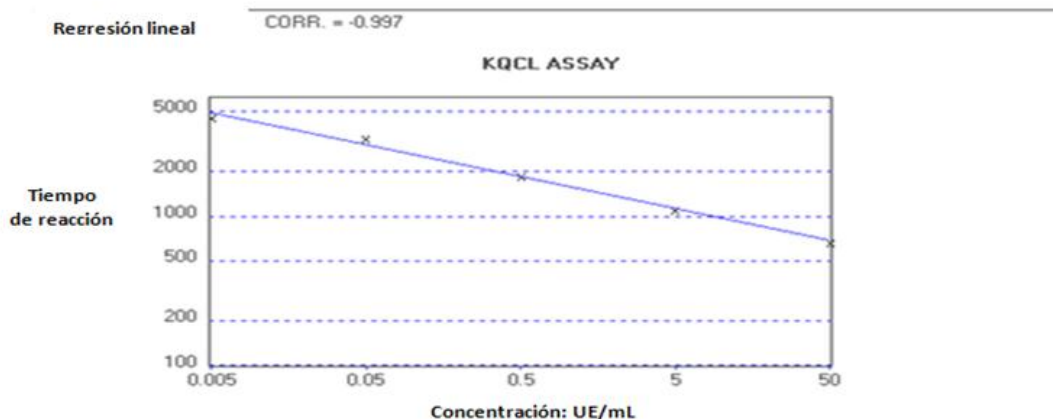


Fig 1: Curva estándar tiempo de reacción vs Control Estándar de Endotoxina CEE (UE/mL)

El pH constituye uno de los factores de inhibición del reactivo LAL por lo que su determinación es muy importante. El pH de la muestra a ensayar debe estar en un rango entre 6,0 y 8,0. Los tres lotes evaluados del producto succinilcolina infantil 100 mg, mostraron valores de pH de 4.1. Sin embargo no fue necesario ajustar con NaOH 0,1 mol/L aprotogénico, el buffer que se empleó en el ensayo permitió el ajuste del pH a valores de 6.1 de las muestras con el reactivo.

El cálculo de la MVD permitió conocer que la mayor dilución en la que se puede detectar presencia de endotoxinas bacterianas en la muestra es 8000.

Los resultados de la prueba de inhibición o realce se muestran en la Tabla 1, en la misma se evidencia que a partir de la dilución 1:2000 los porcentajes de recobrado obtenidos cumplen con el límite establecido (50-200%), sin embargo los resultados indican que en esta dilución los valores se encuentran próximos al límite inferior establecido (50%), por lo que se decidió escoger para la posterior validación la dilución 1:4000.

Tabla 1. Resultados del ensayo de inhibición o realce.

No. de Lotes	Concentración de Endotoxinas (UE/mL)			
	1:800	1:1000	1:2000	1:4000
	% de Recobro (50-200)			
Sp14001	20,03	42,00	66,15	110,8
Sp14002	21,08	49,43	63,18	114,9
Sp14003	29,02	33,59	67,94	112,7

Los ensayos de validación se llevaron a cabo la dilución de trabajo seleccionada (1:4000) con el reactivo de LAL, (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la validación de la dilución de trabajo.

No. de Lotes	Dilución	% de Recobro	Coefficiente de Variación	Decisión
Sp14001	1/4000	114,96		Conforme
Sp14002	1/4000	116,01	0.5	Conforme
Sp14003	1/4000	115,06		Conforme

La determinación de endotoxinas bacterianas realizado a los tres lotes a escala piloto (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la determinación de endotoxinas bacterianas de los lotes piloto del producto en desarrollo succinilcolina infantil 100 mg.

No. de lotes	Dilución	Concentración de endotoxinas (UE/mg)	Decisión
SP14001	1/4000	0,5	Conforme
SP14002	1/4000	0,2	Conforme
SP14003	1/4000	0,2	Conforme
Límite: 2,0 UE/mg			

DISCUSIÓN

La curva estándar obtenida por el analista describe un comportamiento lineal, mostrando una proporcionalidad inversa entre el tiempo de activación y la concentración de endotoxina, con un coeficiente de correlación ($r = 0,997$; superior al límite establecido para este ensayo. Estos resultados indican la destreza del analista para obtener las diferentes concentraciones de endotoxinas, por lo que se puede decir que está calificado. Coincidiendo con lo reportado por otros autores que plantean que la calificación del analista se demuestra si se obtiene un coeficiente de correlación de la curva que cumpla con el límite especificado ($r > 0,98$).¹⁰

En cuanto al pH se debe señalar que diferentes autores hacen referencia al ajuste del mismo como un aspecto fundamental, ya que valores fuera del rango establecido ocasionan interferencia con los resultados.¹² Se pudo comprobar la capacidad bufferizante del reactivo LAL, al ajustar el pH en la mezcla del producto-reactivo.¹³⁻¹⁵

El valor calculado de la MDV permitió definir que sólo se puede diluir el producto hasta 1:8000, ya que a diluciones mayores no es posible detectar el valor límite de endotoxina. Algunos autores hacen referencia a que no se debe utilizar como dilución de trabajo la misma.^{12, 14}

Al evaluar los resultados de la prueba de inhibición o realce en los lotes a escala de laboratorio del producto en desarrollo se evidenció que ninguna de las diluciones ensayadas mostró reducción de la sensibilidad en el ensayo (inhibición), ni un incremento en la sensibilidad del reactivo LAL (potenciación), ya que los porcentajes de recuperación cumplieron con el límite establecido, por lo tanto coincidimos con lo planteado por Castros, 2004 que plantea que en estos casos no existe la posibilidad de que se detecten más endotoxinas de las presentes en la muestra o que se subestime la concentración de endotoxina en la misma.^{14,15}

Los resultados de la validación de la dilución de trabajo, permitió plantear que la misma quedó validada, al obtenerse porcentos de recobro en cada lote y un coeficiente de variación entre los lotes dentro de los límites establecidos. Algunos autores hacen referencia a que la validación del ensayo de la técnica del LAL garantiza con independencia del método o lote que se esté evaluando, que en la dilución determinada del producto no existan interferencias, y por lo tanto sea confiable la cuantificación de endotoxinas en dicha muestra.^{5, 8,10}

La determinación de endotoxinas bacterianas en los tres lotes pilotos del producto en tiempo cero empleando la dilución 1:4000 mostró resultados conforme, al contener una concentración de endotoxinas menor que el límite establecido (2.0 UE/mg). Por tanto se corroboró la aplicación de este método para ensayo de rutina en el control de la calidad y estudio de estabilidad de este producto desde su etapa de desarrollo, cumpliendo con las regulaciones vigentes.^{7,8}

CONCLUSIONES

Se estandarizaron las condiciones de trabajo para la realización del ensayo LAL por el método cromogénico cinético del producto succinilcolina infantil 100 mg, que se desarrolló en Cuba en forma de solución inyectable. Queda validada la dilución de trabajo (1:4000) para la realización de los ensayos de control de la calidad de este producto terminado de producción nacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MNSAP, Formulario Nacional de Medicamentos. Cuba 2011. p: 33-5.
2. Iriarte MJ, Ugarte JC. Utilidad de la determinación de endotoxinas en diferentes ambientes laborales como indicador de riesgo biológicos. *MAGFRE Medicina* 2001; 12(4):234-40.
3. Todar K. Mechanisms of Bacterial Patogenicity Endotoxins. In: *TodarsOnlineTextbook of Bacteriology*. Madison: University of Winsconsin, Departament of Bacteriology. 2008. p: 8. Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/endotoxin.html>
4. Suffredini AF, O'Grady NP. Pathophysiological responses to endotoxins in humans. En: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC, eds. *Endotoxin in health and disease*. New York: Marcel Dekker; 2000. Pp.817-30.
5. Perdomo R. Ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL). *Revista Cubana de Farmacia* 2004; 38(1):8-15
6. Dawson ME. Harmonization of endotoxin standards and Units. *LAL Update* 1997;15(4):2-3
7. The United States Pharmacopeia 35 th Ed. USP 35-NF30. Vol 1. The United States Pharmacopeia convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville MD 20852; USA 2012: 93-97
8. Food and Drugs Administration, 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, 1987. pp: 16-27.
9. Osorio O, Pérez X, Arias J, Rodríguez D, Fernández C. Interferencias en la validación del ensayo de Lisado de Amebocitos de *Limulus* para Oxitetraciclina 500mg/mL *Rev. Cubana Farmacia*.2007; 41(1):12-19.
10. Burguet, N y Brito L .C. Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica. *VacciMonitor* 2012; 21(3):32-6.
11. John, A.B., Kamaruzzaman, B.Y., Jalal K.C.A, Zaleha, K. TAL - a source of bacterial endotoxin detector in liquid biological samples. *International Food Research Journal*. 2012; 19(2): 423-25.
12. Carrillo, C., Ospina, J., Aldana, D., Arias, J y 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.

13. Bang F.B. A bacterial disease of *Limulospolyphemus*. Bull Johns Hopkins Hosp. 1956, 98: 325.
14. Castro, C. Estudios relacionados con el tema *Limulus Amebocyte Lysate (LAL)*: Opciones fotométricas. Impartido por Associates of CAPE COD incorporate. Toronto Canadá. 2004.
15. Castro, C. Estudios relacionados con el tema *Limulus Amebocyte Lysate (LAL)* para la detección de endotoxinas bacterianas. Impartido por Associates of CAPE COD incorporate. En: Hotel Palco 2014 La Habana Cuba.