

Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica

Nancy Burguet,^{1*} Lázaro César Brito²

¹Dpto de I+D de Laboratorios Liorad. Calle 244 / 35 C y 35 D Edif. 59 Apto. 17 San Agustín La Lisa, Cuba.

²Jefe de Laboratorio de Producción de Medicamentos del Hospital "Luisa C de Gandulfo". Municipio Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina.

email: nburguet@liorad.quimefa.cu

Dentro del control de la calidad de los productos farmacéuticos, la United State Pharmacopeia establece la cuantificación de endotoxinas bacterianas por el método de lisado de amebocito de *Limulus*, como monitor de pirógenos para más del 90% de los parenterales que regula. Este método se aplicó de forma específica a vacunas bacterianas y virales, agentes antineoplásicos, radiofármacos y parenterales que se producen en la industria médico farmacéutica. En el presente trabajo se mostró la metodología a seguir para realizar la validación de la técnica de determinación de endotoxinas bacterianas por el método de gelificación. Para ello se confirmó la sensibilidad del reactivo utilizado (0,03125 UE/mL) y la validez de los analistas para poder obtener resultados confiables. Las pruebas preliminares para el producto ensayado, heparina sódica 5000 UI/mL, demostraron que este producto no potencia ni inhibe la reacción del reactivo. Se escogió la dilución de trabajo (1/128) para la validación del método. De esta manera quedaron estandarizadas las condiciones para la validación del test de lisado de amebocito de *Limulus* por gelificación en este producto parenteral, método que se hace extensivo a la determinación de endotoxinas bacterianas en vacunas y en otros medicamentos por vía de administración intravenosa.

Palabras clave: Endotoxinas, validación, LAL.

Introducción

La heparina sódica pertenece a un grupo de medicamentos llamados antitrombóticos que posee acción anticoagulante. Está indicada en la prevención y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa y del tromboembolismo arterial periférico, en otras enfermedades cardiovasculares, así como en la prevención de la formación de coágulos en pacientes sometidos a una intervención quirúrgica del corazón o a hemodiálisis.

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 endotoxinas bacterianas (1, 2), sustancias que administradas por vía parenteral y en dependencia de la dosis son capaces de provocar una respuesta febril, shock y muerte.

Las endotoxinas bacterianas son principalmente lipopolisacáridos (LPS) que se localizan exclusivamente en la membrana externa de las bacterias gramnegativas (3, 4). La historia del descubrimiento del reactivo LAL comienza en 1956 cuando el doctor Frederick Bang reporta la muerte por coagulación intravascular en el cangrejo herradura americano *Limulus polyphemus*, uno de los seres vivos más antiguos que existen, capaces de soportar hasta un año sin alimentarse y de resistir temperaturas y salinidades extremas,

un fósil viviente que habita nuestro planeta desde hace 445 millones de años (antes incluso que los dinosaurios) (5).

Desde que en la década de 1950 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).

La industria farmacéutica requiere estandarizar técnicas rápidas y confiables que permitan detectar la presencia de endotoxinas bacterianas como la prueba del LAL, obtenida a partir de extractos acuosos de amebocitos circulantes del cangrejo de herradura, preparado y caracterizado para ser utilizado como reactivo y detectar o cuantificar las endotoxinas bacterianas que puedan estar presentes en la muestra a la que se le aplica la prueba (7). Las endotoxinas que aportan las bacterias gramnegativas son las que realmente constituyen un problema para la salud humana ya que otras endotoxinas pueden ser controladas con el buen cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación (8, 9). Las endotoxinas bacterianas se refieren al complejo de lipopolisacáridos asociados con la membrana externa de las bacterias gramnegativas como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria* y otros patógenos importantes (10, 11).

EL ensayo del LAL cumple con las nuevas alternativas en cuanto al principio ético sobre el no uso de animales; se ha

* Licenciada en Microbiología y Máster en Ciencias.

aplicado de forma específica a vacunas bacterianas y virales, agentes antineoplásicos, radiofármacos y en medicamentos diseñados para ser aplicados parenteralmente, así como en el control de la calidad de los alimentos y agua inyectable.

El método de LAL se fundamenta en la coagulación de la hemolinfa por medio de la interacción de la endotoxina con los amebocitos contenidos en esta, lo que causa la liberación de una cascada de reacciones que hacen que se forme un gel visible y consistente (2, 12-13).

La Farmacopea de los Estados Unidos (United States of Pharmacopeia (USP) establece la cuantificación de endotoxinas bacterianas por el método LAL como monitor de pirógenos para más del 90% de los parenterales que regula, exigiendo que el contenido de endotoxinas sea inferior a los límites establecidos por la guía de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration (FDA), lo que es requisito indispensable para la comercialización de cualquier producto.

Los principales organismos internacionales, encargados de regular la elaboración de productos farmacéuticos exigen cada vez más en sus protocolos de calidad la aplicación del ensayo LAL, en el control de la calidad en la fabricación de medicamentos administrados por vía intravenosa.

El presente trabajo tiene como objetivo validar la determinación de endotoxinas bacterianas por el método de LAL en el producto farmacéutico heparina sódica 5.000 UI/mL.

Materiales y 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 la muestra debe ser de modo aséptico, para evitar contaminación.

Un aspecto crítico a tener en cuenta es la validación del ensayo (14). Es válido 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 (15-16).

Método de gelificación

El método empleado es semicuantitativo (17). La prueba consiste en la adición de 0,1 mL de lisado y 0,1 mL de producto a evaluar en tubos despirogenizados, que se colocan al baño María a 37 °C y luego se invierte el tubo con cuidado a 180°.

Si la solución ha formado un gel y permanece en el fondo del tubo la prueba es positiva; de lo contrario, si la solución permanece líquida la prueba es negativa (18, 19).

Ensayos preliminares

Confirmación de la sensibilidad del etiquetado

Mediante este ensayo se verifica que no haya variación en la sensibilidad del rótulo del reactivo. Esta se determina preparando una serie de diluciones del control estándar de endotoxina (CSE) *Escherichia coli* O113: H10 por cuadruplicado con concentraciones 2λ , 1λ , $1/2\lambda$, $1/4\lambda$, donde λ es la sensibilidad marcada del reactivo LAL (0,03125), dada en unidades de endotoxina por mililitro UE/mL, a las que se le agrega reactivo de LAL, se llevan a incubación y se leen. Se debe presentar formación del gel en las concentraciones mayores o iguales a la sensibilidad rotulada del reactivo LAL, que no difiera por más de un factor de dos de la sensibilidad etiquetada del reactivo.

Máxima dilución válida

Para realizar el cálculo de la máxima dilución válida (MVD) se hace referencia al límite de endotoxinas permitido (10 UE/mL) por la Farmacopea británica (PB 2009) del producto a evaluar, por ser una formulación con un contenido nominal menor que 100 mL.

Se debe tener en cuenta el límite de sensibilidad de LAL de trabajo. Se aplica la fórmula siguiente (1, 2).

$$MVD = \frac{\text{Límite de endotoxina UE/mL}}{\text{Sensibilidad del reactivo LAL}}$$

Ensayo de inhibición o realce

Se realizaron diluciones dobles desde 1:1 hasta la MVD 1:320 de la muestra en agua con reactivo LAL y diluciones con estándar de endotoxinas; se añadió 100 μ L de reactivo LAL y se procedió según la descripción del método. Se determinó la dilución de trabajo.

Validación de la técnica

- Validación del analista: Se prepararon una serie de diluciones: 0,06; 0,03; 0,015; 0,0075 UE/mL por cuadruplicado a partir de la CSE de 10 UE/mL de potencia, según certificado de la calidad.
- Validación de la dilución de trabajo: Se realiza en base a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares (la dilución de trabajo). Se prepararon diluciones del producto, ensayadas por cuadruplicado y en tres lotes diferentes del producto heparina sódica 5000 UI/mL inyectable, según las indicaciones de la Farmacopea (19).

Cálculo de la media geométrica (GM)

Se determina el promedio geométrico que da la concentración del punto final de la sensibilidad, para lo cual se aplicó la fórmula siguiente:

MG = Antilog x

Donde:

- X es igual a la suma de las concentraciones de punto final, dividido por el número de réplicas realizadas.
- El valor de sensibilidad debe estar en el rango de 0,06-0,01, puesto que el error del método es una dilución.
- El punto final es la última dilución de la serie que da resultado positivo, es decir, donde se forma el gel firme.
- El límite establecido de la desviación estándar para las cuatro réplicas para un límite superior del 99% es de 0,365 (19, 20).

Resultados y Discusión

Se realizó la validación de la técnica de endotoxinas bacterianas por medio del método de lisado de amebocitos de *Limulus* LAL, para el producto heparina sódica 5000 UI/mL. Se confirma la sensibilidad del etiquetado (Tabla 1), donde se comprobó que no hay variación en la sensibilidad del rótulo del reactivo. Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

El cálculo de la MVD arrojó que 1:320 es la dilución permitida en la que se puede determinar el límite de endotoxinas de la muestra.

$$MVD = \frac{10 \text{ UE/mL}}{0,03125 \text{ UE/mL}} = 320$$

Tabla 1. Confirmación de la sensibilidad del etiquetado.

Réplica	Concentración de endotoxina UE/mL					Punto Final
	2λ 0,06	1λ 0,03	1/2λ 0,015	1/4λ 0,0075	CN	
1	+	+	-	-	-	0,03
2	+	+	-	-	-	0,03
3	+	+	+	-	-	0,01
4	+	+	-	-	-	0,03
Media geométrica						0,022

Tabla 2. Caracterización de la muestra. Resultados del ensayo de inhibición. Diluciones del producto.

Ensayos	Réplicas	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:320	CN
A	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
	2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-

Leyenda: A: Diluciones en agua libre de pirógenos; B: Diluciones donde la muestra está marcada con endotoxina.

Se determinó la dilución de trabajo y la ausencia de endotoxinas en el producto y se evidencia su caracterización (Tabla 2).

En la Tabla 2 se verifica que el producto presentó inhibición hasta la dilución 1:32 no tuvo interferencia que afectara la prueba de LAL. Se presentaron positivos desde la dilución 1:64 hasta la máxima dilución válida, teniendo en cuenta que el error del método es más o menos un tubo, se eligió como dilución de trabajo 1:128.

En los ensayos de validación se enfrentó la dilución de trabajo con el reactivo de LAL para confirmar su sensibilidad. Se muestran los resultados de los tres lotes del producto ensayado (Tablas 3, 4 y 5).

Es de vital importancia realizar la validación de la detección de endotoxinas bacterianas por el método de LAL, ya que por medio de esta se logra identificar la dilución de trabajo para los ensayos de rutina que se le realiza al producto terminado de heparina sódica 5000 UI/mL inyectable. La validación por el método de gelificación es una prueba sencilla y rápida que se encuentra en la USP armonizado con la Farmacopea Europea (19, 20).

La validación del rótulo del reactivo LAL y de los analistas se hace con el objetivo de confirmar la sensibilidad del reactivo (0,03125 UE/mL) y verificar la destreza de los analistas al realizar correctamente las diluciones, para obtener las diferentes concentraciones de endotoxinas. Esto se verifica mediante los resultados estadísticos, donde la media geométrica de los logaritmos de los puntos finales está dentro del rango permitido (0,06-0,01) (15).

Los ensayos preliminares permiten conocer la máxima dilución válida (1:320) que se le puede hacer al producto en estudio y aún detectar el límite de endotoxina con el método LAL (17, 21). Resulta de interés destacar que a todo producto se le debe hacer previamente la prueba de inhibición y realce para verificar la ausencia de inhibición, ya que esta puede llevar a resultados falsos positivos. Consecuentemente, es

Tabla 3. Resultados de la validación de la heparina sódica 5000 UI/mL H11002.

Réplicas	Concentración de endotoxina UE/mL				CN	Punto Final	Media geométrica
	2 λ 0,06	1 λ 0,03	1/2λ 0,015	1/4λ 0,0075			
1	+	+	-	-	-	0,03	0,03
2	+	+	-	-	-	0,03	
3	+	+	-	-	-	0,03	
4	+	+	-	-	-	0,03	

Tabla 4. Resultados de la validación de la heparina sódica 5000 UI/mL H11003.

Réplicas	Concentración de endotoxina UE/mL				CN	Punto Final	Media geométrica
	2 λ 0,06	1 λ 0,03	1/2λ 0,015	1/4λ 0,0075			
1	+	+	-	-	-	0,03	0,017
2	+	+	+	-	-	0,01	
3	+	+	-	-	-	0,03	
4	+	+	+	-	-	0,01	

Tabla 5. Resultados de la validación de la heparina sódica 5000 UI/mL H11004.

Réplicas	Concentración de endotoxina UE/mL				CN	Punto Final	Media geométrica
	2 λ 0,06	1 λ 0,03	1/2λ 0,015	1/4λ 0,0075			
1	+	+	-	-	-	0,03	0,036
2	+	-	-	-	-	0,06	
3	+	+	-	-	-	0,03	
4	+	+	-	-	-	0,03	

necesario determinar que la concentración de endotoxinas del producto que está en ensayo no interfiera de una forma significativa con la prueba y definir la dilución de trabajo (1:128) a emplear de forma rutinaria, para realizar la determinación de endotoxinas bacterianas a los lotes de este producto. Según la experiencia de otros autores en la dilución determinada del producto no existe interferencias con lo cual se garantiza, independientemente del lote, que sea confiable la cuantificación de endotoxinas en dicha muestra (14).

La información obtenida a través de la validación del método permite plantear que el método queda validado para el producto heparina sódica 5000 UI/mL en esa dilución de trabajo y con un reactivo LAL de sensibilidad (0,03125UE/mL), ya que no se presentaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos y las especificaciones de la media geométrica. Además, los controles negativos para todas las pruebas fueron siempre negativos, por lo tanto se descarta de esta forma alguna contaminación que pudiera dar falsos positivos. Estos resultados se corresponden con lo reportado internacionalmente (12,13).

La selección adecuada de la sensibilidad del reactivo del LAL, según el límite de endotoxina del producto a evaluar y confirmada en la sensibilidad del rótulo y en la validación del operario, permite obtener resultados confiables. Los resultados de las pruebas preliminares, diluciones que se realizaron en agua libre de pirógenos y donde la muestra está marcada con endotoxina, evidencian que el producto ensayado no inhibe ni potencia la reacción, ni interfiere con el ensayo. Además, permitió escoger la dilución de trabajo 1:128, con la cual se realizó su validación y se pudo comprobar que el método queda validado para el producto heparina sódica 5000 UI/mL.

Referencias

1. The United States Pharmacopeia, 33th ed. USP33-NF28. Rockville: Mack Printing; 2010.
2. British Pharmacopoeia. Heparin Injection. Formulated Preparations: Specific Monographs. Volume 3. London, UK: British Pharmacopoeia; 2009.
3. Perdomo R. Ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL). Revista Cubana de Farmacia 2004;38(1):8-15.

4. 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 Association* 1979;33(2):81-95.
5. Lewn J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1964;115(1):265-70.
6. Cooper JF. Principles and applications of the Limulus test for pyrogen in parenteral drugs. *Bull Parenteral Drug Assc* 1975;29(3):122-30.
7. Cooper JF, Hochtein HD, Seligmann EB. The Limulus test for endotoxin (Pyrogen) in radiopharmaceutical and biological. *Bull Parenter Drug Assc* 1972;26(4):153-62.
8. United States Pharmacopeia 32th: The National Formulary 27th ed. Bacterial Endotoxins Test. Rockville, USA: USP-NF; 2009. p. 93.
9. CECMED. Buenas Prácticas para la Fabricación de Ingredientes Farmacéuticos Activos. Anexo No. 09. Resolución No. 03/06 y Regulación No. 16-2006. Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. Ámbito regulador: La Habana: Órgano Oficial Regulatorio, Centro para el Control Estatal de la calidad de los medicamentos; 2006 nov; 6(Supl.Especial):1-16.
10. Todar K. Mechanisms of bacterial pathogenicity: endotoxins. In: *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Madison: University of Wisconsin, Department of Bacteriology; 2008. p. 8.
11. Iriarte MJ, Ugarte JC. Utilidad de la determinación de endotoxinas en diferentes ambientes laborales como indicador de riesgo por agentes biológicos. *MAGFRE Medicina* 2001;12(4):234-40.
12. Roth R, Tobia PS. Lipopolysaccharide-binding proteins of Limulus amebocyte yeast. *Infection Immunity* 1993, 61(3):1033-9.
13. Speer BR. Xiphosura: Horseshoe crabs. Routine testing and retest. Associates of Cape Cod Inc. LAL Update.1997; 15(2). Disponible en: <http://www.ucmp.berkeley.edu/arthropoda/chelicerata/xiphosura.html>
14. Food and Drugs Administration (FDA). 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. Silver Spring, MD, USA: FDA; 1983.
15. Associates of Cape Cod Inc. Manual de Instrucción del Test LAL Pyrotell®. Vial de Ensayo Único. East Falmouth, MA, USA: ACC; 2011.
16. Baird R. Instructions for reconstitution, Control Standard endotoxin (CSE) *Escherichia coli* O11: H10. East Falmouth, MA, USA: ACC; Inc; 1988.
17. Associates of Cape Cod Inc. Routine testing and retest. LAL Update 1997;15(2):1-4.
18. 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.
19. 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 Farmacia* 2007;41(1):12-9.
20. Morote M, Otero M, Chávez G. Validación de la Técnica LAL (GEL CLOT) en los Agentes de Radiodiagnóstico y Radioisótopos. *Alasbimn Journal* 2002;4(16). Disponible en: <http://www.alasbimnjournal.cl/revistas/16/secb/0,1990,SCID%253D1497,00.html>
21. Dawson ME. Preliminary testing. LAL Update 1996;14(1):1-5.

Validation of the LAL method for the determination of bacterial endotoxins in injectable sodium heparin

Abstract

The United States Pharmacopoeia, in the quality control of pharmaceutical products, establishes the quantification of bacterial endotoxins by the Limulus amebocyte lysate method as pyrogen monitor for more than 90% of the parenteral Solutions it regulates. This method was specifically applied to bacterial and viral vaccines, antineoplastic agents, radiopharmaceutical and parenteral drugs produced in the pharmaceutical medical industry. This paper shows the methodology followed to perform the validation of the technique for the determination of bacterial endotoxins by the method of gelation. For that reason, the sensitivity of the reagent used (0.03125 EU / mL) and the validity of the analysts to obtain reliable results were confirmed. Preliminary tests for the assay product sodium Heparin 5000 IU/mL showed that this product does not enhance or inhibit the reaction of the reagent. A working dilution (1/128) was chosen to validate the method. Thus, the conditions for the validation of test Limulus amebocyte lysate gelation were standardized in this parenteral product. Therefore, the method is extended to the determination of bacterial endotoxins in vaccines and other medicines which administration route is intravenous.

Keywords: Endotoxins, validation, LAL.