



VALORACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS EN RANITIDINA Y PENICILINA G SÓDICA INYECTABLE MEDIANTE LA PRUEBA DE LISADO DEL AMEBOCITO DE *Limulus*

C. Carrillo, J. Ospina¹, D. Aldana¹, J. Arias², C. Echeverri²

¹ Laboratorios Quasfar M & F.S.A.

² Grupo Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología.
Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana,
Cra. 7ª No. 40-62, Bogotá, Colombia
jdcarias@javeriana.edu.co

RESUMEN

Se realizó la estandarización y valoración de endotoxinas bacterianas por la técnica de Lisado del Amebocito de *Limulus* (LAL) para dos productos farmacéuticos: penicilina G sódica y ranitidina inyectable por el método de gelificación. Para ello se tomaron tres muestras de tres lotes diferentes; las muestras fueron escogidas al azar y se tomó una muestra del principio, una de la mitad y otra del final de la producción para cada lote muestreado. Con las muestras de cada lote se realizó un pool, quedando así tres sublotes para analizar, dándole mayor confiabilidad al método. Se comprobó la sensibilidad del reactivo de LAL (0.25 UE/ml) y se calificó al operario con el fin de obtener resultados confiables. Se consultó en la USP XXVI el límite de endotoxina para penicilina G sódica, 0.01 UE/100 UI y ranitidina 7 UE/mg. Se calculó la máxima dilución válida (MDV) que fue de 1:400 y 1:700 respectivamente; se practicaron los ensayos preliminares (Unspike y Spike) con los cuales se determinó la Dilución de trabajo para penicilina 1:100 y ranitidina 1:200. Con el ensayo final se valoró la presencia de endotoxinas bacterianas en los dos productos inyectables.

Palabras clave: endotoxinas, estandarización, gelificación, Lisado de Amebocito de *Limulus*, máxima dilución válida.

ABSTRACT

The standardization and evaluation of bacterial endotoxins by the *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test was carried out for two injectable pharmaceutical products: sodium penicillin G and ranitidine using the Gel-Clot technique. For this process, three samples were taken from three different lots; the samples were chosen at random and a sample was taken from the beginning, the midpoint and again at the end of the production of every lot sampled. The samples from each lot were pooled, thus leaving three sub lots to analyze, giving greater trustworthiness to the method. The sensitivity of the LAL reagent (0,25 UE/ml) was verified on behalf of the worker in order to obtain reliable results. The endotoxin limits for Sodium Penicillin G, 0,01UE/100 UI, and Ranitidine, 7UE/mg, were determined by consulting USP XXVI. The maximum valid dilution (MDV) was calculated to be 1:400 and 1:700 respectively; the preliminary assays employed (Unspike and Spike) determined the working dilution for penicillin, 1:100, and ranitidine, 1:200. With the final assay the presence of bacterial endotoxins was evaluated in both injectable products.

Key words: endotoxins, *Limulus* amoebocyte lysate, maximum valid dilution, standardization, gel-clot.

INTRODUCCIÓN

Hoy día, la calidad, inocuidad y seguridad de los productos farmacéuticos inyectables es de relevante importancia debido a su amplia formulación en la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades. En la industria de medicamentos parenterales grandes volúmenes de agua libre de pirógenos son requeridos para la preparación de medicamentos inyectables. El ambiente de los laboratorios, el personal, los implementos y equipos de trabajo, así como el agua y materias primas, albergan microorganismos que se desarrollan y afectan la calidad de los medicamentos parenterales. Un contaminante propio de origen bacteriano en estos medicamentos son las denominadas endotoxinas, provenientes de las bacterias gram negativas. Estas endotoxinas producen consecuencias en el organismo y en algunos casos pueden causar la muerte convirtiéndose en un peligro para el hombre.

Es por esto, que la industria farmacéutica requiere estandarizar técnicas rápidas y confiables, que permitan detectar la presencia de endotoxinas bacterianas, como lo es la prueba del Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL). Es usado para detección de endotoxinas (derivadas del lipopolisacárido LPS de las bacterias gram negativas). Se basa en la aglutinación de extractos de amebocito de sangre de *Limulus* (cangrejo de mar) producido por cantidades del orden de picogramos de LPS. Puede detectar 300 células de *E. coli*. El método detecta células viables y no-viables. Es muy rápido y permite garantizar la calidad de productos que contribuyen al mejoramiento de la calidad humana.

La historia del descubrimiento del reactivo LAL comienza en 1956, cuando el doctor Frederick B. Bang reporta la muerte por coagulación intravascular en el cangrejo herradura americano *Limulus polyphemus*

(Bang, 1956) Bang, junto a Jack Levin, revela en 1964 que las endotoxinas son el vector causante de la coagulación de la hemolinfa del *Limulus* (Levin, Bang, 1964). Cuatro años más tarde, estos investigadores comprueban que los elementos responsables de la coagulación inducida por endotoxinas son de naturaleza enzimática, y se encuentran dentro de los amebocitos, único tipo de células presentes en la hemolinfa azul de los cangrejos herraduras. Por lo tanto, el reactivo LAL es un extracto acuoso de los amebocitos, compuesto por una cascada de enzimas serino proteasas tipo tripsina capaz de reaccionar frente a pequeñas cantidades de endotoxinas. La bioquímica de la reacción del LAL se conoce en detalle y el mecanismo en cascada parece ser el responsable de su extraordinaria sensibilidad (Iwanaga, 1993).

Detección de endotoxinas mediante el ensayo del LAL

En tanto que el ensayo de pirógenos en conejos es capaz de detectar cualquier sustancia pirogénica, el ensayo del LAL sólo detecta endotoxinas. Las endotoxinas son compuestos químicos complejos que se encuentran exclusivamente en la membrana externa de la pared celular de las bacterias gram negativas (Pearson, 1985; Weary, Pearson, 1988).

Este aspecto a primera vista es, sin lugar a dudas, una desventaja para la implementación del ensayo en la liberación de producto terminado. Sin embargo, los primeros defensores de la aplicación del LAL en la industria farmacéutica plantearon que esta característica no era un inconveniente determinante, debido a que las endotoxinas eran el pirógeno más relevante por las razones que se detallan a continuación. En primer lugar, como las bacterias gram negativas son tan ubicuas, capaces incluso de colonizar el agua destilada, pue-

de esperarse que ellas y/o sus endotoxinas estén presentes en cierto nivel en la mayoría de los artículos, contaminando comúnmente las materias primas y el equipamiento empleado para la producción de inyectables (Gould, 1998; Weary, 1990). Ellas son el pirógeno que más se ha encontrado entre los lotes contaminados (Gould, 1998; Weary, 1984), y debido a su alta resistencia a la destrucción térmica y química, sobrevive a los métodos ordinarios de esterilización (Weary, 1985). Por último, las endotoxinas se caracterizan sobre todo por su potente actividad biológica, por lo que son capaces de producir profundos cambios fisiológicos cuando son administradas por vía parenteral (Pearson, 1985; Suffredini *et al.*, 2000). Una dosis de 1-10 ng/kg de endotoxina puede provocar una respuesta febril en el hombre (Hochstein *et al.*, 1994).

Aparición del LAL en la industria farmacéutica

Cooper aplica por primera vez el LAL a un parenteral, radiofármacos de corta vida media, los cuales no podían evaluarse por el método en conejos, y reconoce la importancia de la equivalencia entre ambos ensayos (Cooper *et al.*, 1970). Posteriormente demuestra la equivalencia y que el LAL resultó ser al menos 10 veces más sensible. Refiere algunas ventajas del incipiente método como su simplicidad, requiere menos tiempo y volumen de muestra, y es un método de cuantificación (Cooper *et al.*, 1971; Cooper *et al.*, 1972).

La alta sensibilidad del LAL es particularmente importante para las drogas intracisternales, pues el método en conejos no es lo suficientemente sensible para la evaluación de pirógenos en estas drogas. Cooper demuestra por primera vez que clínicamente los pirógenos son más tóxicos por vía intracisternal (Cooper, 1975). Esta observación se había realizado ya por

Bennet *et al.*, (Bennet, 1957) quienes establecieron que los efectos tóxicos de la endotoxina administrada por vía intracisternal en perros y conejos son 1.000 veces más potentes para producir fiebre que la vía intravenosa.

Por su efecto farmacológico, ciertos citostáticos, algunos sedativos y anestésicos, corticosteroides, derivados de la fenotiazina y antipiréticos, no son posibles evaluar por el método en conejos, puesto que enmascaran el potencial pirogénico de las muestras (Cooper *et al.*, 1971; Cooper *et al.*, 1975).

Los trabajos de Mascoli y Weary describen un monumental número de ensayos de pirógenos en conejos y LAL. Ellos concluyeron que las endotoxinas son el pirógeno principal, que el LAL es mucho más sensible y observaron considerable variabilidad del ensayo en conejos. Sin embargo, nunca observaron un negativo en LAL para un positivo en conejos (Mascoli, 1979). Reconociendo el potencial del ensayo del LAL para la industria farmacéutica, la compañía norteamericana Mallinckrodt, Inc., logró en 1971 la primera producción exitosa de reactivo LAL a gran escala (Suffredini *et al.*, 2000).

Métodos del LAL

Existen 3 variaciones básicas del ensayo del LAL en el mercado: método de gelificación o "gel-clot", turbidimétricos y cromogénicos. Cada fabricante de juegos de reactivos describe su propia metodología, pero en general la diferencia entre los protocolos es pequeña (Novitsky, 1991). La correlación entre los métodos se basa en comparar la menor dilución de un producto dado a la cual se elimina la interferencia. En general, existe una correlación moderada entre los métodos cuando el reactivo LAL es producido por el mismo fabricante e incluso mejor si es del mismo

lote, mientras que puede ser muy diferente hasta para el mismo método cuando el reactivo se produce por distintos fabricantes. (Dawson, 1995). Es por esto que uno de los aspectos críticos es la validación del ensayo, con lo cual se garantiza independientemente del método o lote que a una dilución determinada del producto no existan interferencias, y por lo tanto, sea confiable la cuantificación de endotoxinas en dicha muestra. Aún subsisten confusiones con respecto a la validación del método, hay que puntualizar que lo que se valida es la muestra o su dilución, no se trata, por ejemplo, de realizar ensayos de linealidad, exactitud o precisión como se describe para la mayoría de los métodos analíticos. La validación del LAL se presenta en detalle en la guía de la FDA (Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test., 1987). Además, para el lector interesado en este aspecto existe literatura donde se suministra información para ejecutar la validación de un producto empleando el método del LAL (Dawson, 1996; Dawson, 1997; Cooper, 1999).

Estandarización del ensayo del LAL

Después del descubrimiento y optimización del reactivo LAL, posiblemente el aspecto más estudiado y controversial ha sido la estandarización del ensayo. Las endotoxinas difieren entre ellas en su actividad biológica o potencia, es decir, la pirogenicidad o reactividad frente al ensayo del LAL de una endotoxina con determinada masa puede diferir significativamente de otra con igual masa. (Dawson, 1993; Dawson, 1997).

Reconociendo este problema, la FDA concluyó que era necesaria una preparación de endotoxinas adecuada para la estandarización del ensayo del LAL. Después de acumular suficientes datos y experiencia con el lote de estándar de referencia primario de endotoxina EC-2, la FDA le

asignó arbitrariamente una potencia de 5 000 UE/vial o 5 UE/ng. Por lo tanto, 1 UE equivale a 0,2 ng de EC-2. Esta es una expresión de la actividad de las endotoxinas en el ensayo del LAL (Cooper *et al.*, 1972). La potencia de los lotes de estándar de referencia ulteriores se ha referido a la del lote EC-2. En un estudio en voluntarios sanos se estableció que la dosis pirogénica media capaz de provocar una respuesta febril en humanos era de 5 UE/kg/h (Hochstein *et al.*, 1994). Como el método del LAL es cuantitativo, se empleó este valor para la determinación del límite de endotoxinas en cada inyectable o nueva formulación. El límite de endotoxinas de un producto está relacionado con su dosis máxima. En el caso de los productos genéricos aparecen en sus respectivas monografías en las farmacopeas. La guía directiva de la FDA del 1987 describe el procedimiento para el cálculo del límite de endotoxinas de un producto que no esté reportado o que se emplee en una dosis diferente (Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test, 1987).

Afortunadamente se ha logrado la armonización de los distintos estándares de endotoxinas entre las farmacopeas de los Estados Unidos (USP), la EP, la OMS y la FDA. (Dawson M.D., 1997). Este estándar se preparó en el Reino Unido por Stanley Poole y contiene 0,1 ng de endotoxinas por vial (10.000 UE), (Poole, 1997), está disponible comercialmente a través de estas instituciones como lote G, Tercera Preparación de Referencia Biológica BRP-3, Segundo Estándar Internacional de Endotoxinas y lote EC-6 respectivamente. Independientemente de la diferencia entre los nombres, el contenido de los viales es idéntico. Los europeos y la OMS continúan reportando las unidades de endotoxinas en unidades internacionales, pero gracias a la armonización, 1 UI = 1 UE (Dawson, 1993).

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 las muestras se debe hacer asépticamente para evitar contaminación. Las condiciones para la despirogenización del material de vidrio es por tratamiento por calor seco, las temperaturas recomendadas son de 250°C por 30 minutos ó 180°C por 3 horas y además, El pH de las muestras a trabajar, debe estar en un rango de 6.0 a 8.0, si no es así se procede a ajustarlo con solución estéril apirógena de NaOH 0.1N o HCl 0.1N.

Estandarización del método LAL

Calificación del operario: para esto es necesario preparar muestras que contengan concentraciones conocidas de endotoxinas, mediante diluciones a partir de 10 UE/ml del CSE para que la concentración sea 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 UE/ml, adicionar el reactivo de LAL, realizar el análisis por cuadruplicado a cada dilución, colocar en baño serológico a 37°C por una hora. Completado el tiempo realizar las lecturas, estableciendo 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.

Confirmación sensibilidad del LAL: la confirmación de sensibilidad del reactivo LAL se debe realizar cada vez que se trabaje con un nuevo lote del LAL. Para esto se utiliza reactivo multidosis de LAL lisado de *Limulus* Amebocito (sensibilidad 0.25 UE/ml) viales de 5 ml. Control de Endotoxina Estándar (CSE) de *E. coli* 0113, con potencia certificada de 5000 UE/vial. Agua certificada libre de endotoxinas para

reconstitución de LAL y la endotoxina. Viales de 50 ml. Solución de NaOH 0.1N. Agua para inyección libre de pirógenos. Se realiza preparando diluciones a partir de 10 UE/ml del (CSE) y se obtienen concentraciones finales de 0.5UE/ml=2λ, 0.25UE/ml=1λ, 0.125UE/ml=0.5λ, 0.06UE/ml=0.25λ, 0.03UE/ml=0.125λ, donde lambda (λ) es la sensibilidad marcada del reactivo de LAL en unidades de endotoxina por mililitro. Se adicionan las concentraciones del CSE al reactivo de LAL, realizar el análisis por duplicado o triplicado a cada dilución. Colocar en baño maría a 37°C x 1 hora, una vez se haya completado el tiempo realizar las lecturas estableciendo la desviación estándar y el promedio geométrico, el cual da el grado de variabilidad y la concentración del punto final de la sensibilidad el cual debe estar en el rango de 0.5 λ - 2 λ.

Estimación de la máxima dilución válida: para esto se utilizó, penicilina G sódica 1'000.000 UI. Ranitidina inyectable 50 mg/2 ml, los cálculos se realizan tomando el límite de endotoxina permitido por la USP del producto a analizar, revisando la presentación del producto y límite de sensibilidad del LAL de trabajo; aplicando la siguiente fórmula según la USP XXVI:

$$\text{MDV} = \frac{\text{Límite de endotoxina} \times \text{potencia}}{\text{Sensitividad del LAL}} \quad (1)$$

Para la realización de los ensayos preliminares de los lotes del producto terminado se practican las diluciones de acuerdo al cálculo de la MDV por cuadruplicado, con el objeto de comprobar si hasta la mayor dilución realizada se detecta la presencia de endotoxina y si existe alguna inhibición en su detección, para ello se realizan los ensayos con endotoxina (spike) y sin endotoxina (unspike). Simultáneamente en

el ensayo spike se escoge la dilución de trabajo para la detección de endotoxinas bacterianas en el producto.

Dilución de trabajo: la dilución de trabajo se selecciona después de los ensayos preliminares con el fin de determinar una dilución óptima para los ensayos de rutina, esto teniendo en cuenta el límite de endotoxina y la MDV, ésta debe ser mínimo dos veces mayor que la primera dilución en la cual la interferencia no es evidente y no debe sobrepasar la MDV. Una vez se tenga determinada la dilución de trabajo del producto deseada, se procede a realizar por cuadruplicado el ensayo de la misma, en la cual se varía la cantidad de endotoxina (0.5, 0.25, 0.125 y 0.06) y la cantidad de producto es fija, con el fin de verificar la sensibilidad de la dilución de trabajo ante determinada cantidad de endotoxina.

Tratamiento estadístico de los resultados: se llama punto final al último punto en el cual se lee un positivo. A este punto final se le calcula el logaritmo. Una vez se tengan los respectivos logaritmos se halla la sumatoria (Σ) y luego el promedio (X). Con el valor del promedio (X) se calcula el promedio geométrico (GM) de la siguiente forma:

$$GM = \text{antilog } X \quad (2)$$

El promedio debe encontrarse entre 0.5-0.125.

La desviación estándar (λ_{n-1}), también debe calcularse con base en los datos obtenidos al calcularse el logaritmo del punto final donde:

- n = número de datos
- X = logaritmos punto final
- m = promedio

$$\lambda_{n-1} = \sqrt{\frac{\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2/2}{n-1}} \quad (3)$$

Donde la desviación estándar debe ser $\lambda < 0.365$ para que los resultados sean válidos. Tanto el GM como la desviación estándar deben cumplir con los respectivos límites; si alguno de los dos no cumple, la prueba se debe repetir o examinar las diluciones realizadas previamente.

RESULTADOS

La muestra de penicilina G sódica registró un pH de 5.95 y la ranitidina inyectable registró un pH de 6.7. Estos pH indican que las muestras se encontraban dentro del rango óptimo establecido. La endotoxina empleada para la preparación de las diluciones de los análisis realizados tenía una concentración de 500 UE/ml.

Al calificar al operario y verificar la sensibilidad del reactivo de LAL (tablas 1 y 2) y aplicarles el tratamiento estadístico se estableció que los resultados obtenidos fueron los esperados, ya que la media geométrica se encuentra dentro del rango de aceptación (0.125 - 0.5) y la desviación estándar fue inferior al límite de confianza estadístico (< 0.365).

Para el operario la media geométrica fue de 0.42 y la desviación estándar de 0.15. Con estos resultados se determinó que el operario 1 estaba apto para realizar los ensayos preliminares, ya que se encontraba dentro del rango del límite de sensibilidad y por debajo del límite de desviación estándar (Agudelo, 1999; Agudelo, 2001; Arias, 2001).

Para la verificación del rótulo del reactivo LAL la media geométrica fue de 0.42 y la desviación estándar fue de 0.15. Con estos resultados se determinó que la sensibilidad del rótulo del reactivo de LAL es la correspondiente, por tanto, es apto para realizar los ensayos preliminares, ya que se encuentra dentro del rango del límite de sensibilidad, y por debajo del límite de desviación estándar.

Tabla 1
Calificación del operario

N° de réplicas	Concentración de endotoxinas					Punto final
	0.5	0.25	0.125	0.06	C (-)	
1	+	-	-	-	-	0.5
2	+	-	-	-	-	0.5
3	+	-	-	-	-	0.5
4	+	-	-	-	-	0.5
LAL (UE / ml)						Concepto
Límite de sensibilidad	0.125 - 0.5		Media geométrica		0.42	Cumple
Límite desviación estándar	<0.365		Desviación estándar		0.15	Cumple

Tabla 2
Verificación de la sensibilidad LAL

N° de réplicas	Concentración de endotoxinas					Punto final
	0.5	0.25	0.125	0.06	C (-)	
1	+	-	-	-	-	0.5
2	+	-	-	-	-	0.5
LAL (UE / ml)						Concepto
Límite de sensibilidad	0.125 - 0.5		Media geométrica		0.42	Cumple
Límite desviación estándar	<0.365		Desviación estándar		0.15	Cumple

Para establecer la dilución de trabajo con la cual se llevó a cabo la valoración, se tuvo en cuenta que fuera menor a la MDV y encontrarse en una parte intermedia de las

diluciones donde no es evidente la interferencia. La MDV para la penicilina G fue de 1:400, se determinó así:

$$\frac{0.01 \text{ UE}}{100 \text{ UI}} \times \frac{1'000.000 \text{ Unidades de penicilina}}{1 \text{ ml}} = 100 \text{ UE/ml}$$

$$\text{MDV} = \frac{\text{Límite de endotoxina}}{\text{Sensibilidad LAL}} = \frac{100 \text{ UE/ml}}{0.25 \text{ UE/ml}} = 400$$

Con la ranitidina inyectable se determinó que la MDV era de 1:700.

$$\text{MDV: } \frac{7\text{UE/mg} \times 50 \text{ mg/2 ml}}{0.25 \text{ UE/ml}}$$

Ensayos preliminares

Para la penicilina G sódica y para la ranitidina los ensayos Unspike demostraron que ninguno de los dos productos poseen en su composición, endotoxinas o principios activos que generen una reacción positiva.

Los resultados en los ensayos Spike demostraron que para la penicilina G sódica se inhibe la reacción hasta la dilución 1:16, con una reacción positiva desde la dilución 1:32 hasta la dilución 1:128, por eso se determinó como dilución de trabajo la dilución 1:100.

Para la ranitidina el ensayo Spike fue positivo a partir de la dilución 1:2 y hasta la dilución 1:256, determinamos que una buena dilución de trabajo, podía ser 1:200.

Valoración de endotoxinas en penicilina G sódica, primer sub lote

Para el primer lote de penicilina G sódica la media geométrica fue de 0.21 y la desviación estándar fue 0.28. Con estos resultados se determinó que el primer lote cumple especificaciones ya que se encuentra dentro del rango del límite de sensibilidad y por debajo del límite de desviación estándar (Agudelo, 1999; Agudelo 2001; Arias, 2001).

Tabla 3
Valoración de endotoxinas primer sub lote

N° de réplicas	Concentración de endotoxinas					Punto final
	0.5	0.25	0.125	0.06	C (-)	
1	+	+	+	-	-	0.125
2	+	-	-	-	-	0.25
3	+	-	+	-		0.125
4	+	+	-	-		0.25
LAL (UE / ml)						Concepto
Límite de sensibilidad	0.125 - 0.5		Media geométrica		0.21	Cumple
Límite desviación estándar	<0.365		Desviación estándar		0.288	Cumple

Para el segundo lote de penicilina G sódica la media geométrica fue de 0.17 y la desviación estándar fue 0.30. Con estos resultados se determinó que el segundo lote cumple especificaciones ya que se encuentra dentro del rango del límite de sensibilidad y por debajo del límite de desviación estándar (Agudelo, 1999; Agudelo, 2001; Arias, 2001).

Para el tercer lote de penicilina G sódica la media geométrica fue de 0.10 y la desviación estándar fue 0.29. Con estos resulta-

dos se determinó que el tercer lote no cumple especificaciones ya que se encuentra fuera del rango del límite de sensibilidad (Agudelo, 1999).

Valoración de endotoxinas en ranitidina inyectable, primer sub lote

Para el primer sub lote de ranitidina la media geométrica fue de 0.25 y la desviación estándar fue 0.24, con estos resultados se determinó como satisfactoria la prueba del método LAL para el primer sub lote de

Tabla 4
Valoración de endotoxinas primer sublote

N° de réplicas	Concentración de endotoxinas					Punto final
	0.5	0.25	0.125	0.06	C (-)	
1	+	-	-	-	-	0.5
2	+	+	+	-	-	0.125
3	+	+	-	-		0.25
4	+	+	-	-		0.25
LAL (UE / ml)						Concepto
Límite de sensibilidad	0.125 - 0.5		Media geométrica		0.25	Cumple
Límite desviación estándar	<0.365		Desviación estándar		0.24	Cumple

ranitidina bajo la dilución de trabajo establecida ya que se encontró dentro del rango del límite de sensibilidad y por debajo del límite de desviación estándar.

Para el segundo sublote de ranitidina la media geométrica fue de 0.06 y la desviación estándar fue 0, con estos resultados se determinó la prueba no satisfactoria para el segundo sublote de ranitidina bajo la dilución de trabajo establecida ya que no se encontró dentro del rango del límite de sensibilidad permitido.

Para el tercer sublote de ranitidina la media geométrica fue de 0.09 y la desviación estándar fue 0.18, con estos resultados se determinó la prueba no satisfactoria para el tercer sublote de ranitidina bajo la dilución de trabajo establecida ya que no se encontró dentro del rango del límite de sensibilidad permitido.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para realizar los análisis fue importante considerar el certificado de análisis de Control de Endotoxina Estándar (CSE), el cual nos permitió confirmar que el lote de entoxina con el que se trabajó es un sustituto del estándar primario, el cual cumple

con los parámetros establecidos para obtener resultados confiables. Al obtener los resultados de la calificación de operario y la verificación de la sensibilidad del reactivo de LAL; y aplicarles el tratamiento estadístico se estableció que los resultados obtenidos fueron los esperados, aunque se debe tener en cuenta que al realizar la verificación de la sensibilidad se observó que el reactivo LAL utilizado en estos ensayos presentó un límite de detección de 0.5 UE/ml, lo que se puede deber a que el lote de endotoxina que se utilizó no es muy reciente y según el certificado de análisis puede sufrir cambios en la potencia debido al tiempo o a errores en la manipulación. Pero según los datos estadísticos los dos ensayos cumplen con los parámetros establecidos por la USP y la FDA.

En el ensayo Unspike se demostró que el producto analizado de penicilina G sódica y ranitidina, no presentan endotoxinas, ni sustancias que pudieran dar falsos positivos, pues los resultados de todas las diluciones de las dos réplicas incluidos sus controles, fueron negativos. En el ensayo Spike la penicilia G sódica presentó inhibición hasta la dilución 1:16, desde la dilución 1:32 hasta la última (1:128) se obtuvieron resultados positivos y la

ranitidina no presentó inhibición desde la dilución 1:2 hasta la última 1:256. Estableciendo así que la interferencia se superó con las diluciones.

La reacción LAL se puede ver interferida frecuentemente por la presencia de inhibidores en la muestra, en el caso de la penicilina G sódica, la interferencia obtenida en el ensayo, en las primeras cinco diluciones del ensayo "Spike" pudo deberse al pH el cual se encontraba en la muestra sin diluir en 5.95, por debajo de los límites óptimos para el ensayo pH 6.0 – 9.0. En la ranitidina la interferencia pudo ser causada por varios factores, entre ellos alcoholes, sustancias inmiscibles con el reactivo LAL, cationes divalentes, sal excesiva y agentes quelantes asociados al producto. La literatura dice que los alcoholes son inhibidores en la detección de endotoxinas bacterianas y se conoce que la formulación del producto tiene este alcohol, razón por la cual es muy probable establecer que este elemento pueda ser un factor de inhibición para la reacción endotoxina-LAL.

Para establecer la dilución de trabajo con la cual se llevó cabo la valoración, se escogió como dilución de trabajo 1:100 para la penicilina G sódica y 1:200 para la ranitidina. Una vez escogidas las diluciones de trabajo se realizó la valoración de endotoxinas bacterianas en los tres lotes de penicilina G sódica y ranitidina, donde se verificó la sensibilidad del reactivo de LAL en presencia de la dilución de trabajo.

El primer y segundo subote de penicilina G sódica arrojaron los resultados esperados, al realizar el tratamiento estadístico la media geométrica y la desviación estándar estuvieron dentro de los límites de aceptación, aunque en los dos lotes analizados las cuatro réplicas no fueron uniformes. Hubo variaciones que se pueden deber a error de manipulación o al material que después del lavado pudieron quedar algunos

tubos con residuos de NaOH, el cual causa interferencia evitando la formación del coágulo. Con estos resultados se puede afirmar que estos dos lotes no presentan una concentración de endotoxinas superior al límite permitido por la dilución de trabajo.

En el tercer subote analizado los resultados obtenidos estuvieron fuera de especificaciones, la media geométrica estuvo fuera del límite de sensibilidad. Esto debido a la presencia de dos resultados positivos en la concentración de endotoxina de 0.06 UE/ml, indicando posiblemente que el producto tiene una concentración de endotoxinas que supera el límite para la dilución de trabajo.

Con estos resultados se puede decir que la dilución de trabajo 1:100 es adecuada, aunque muy estricta ya que el límite permitido es de 100 UE/ml y con la dilución 1:100 se reduce a 25 UE/ml, se puede tomar una dilución mayor que amplíe más el límite, entre 10 y 20 unidades de endotoxina por debajo del límite permitido.

En el primer subote de ranitidina (tabla 4) la media geométrica se encontró dentro del límite de sensibilidad (0.125-0.5) y por debajo del límite de desviación estándar, considerando así que la dilución de trabajo 1:200 sería apropiada ya que no interfirió en la reacción y la endotoxina mantuvo su actividad frente a la dilución del producto al igual que el reactivo LAL, el cual conservó su límite de detección frente a los mismos. Al ensayar el segundo subote, con la dilución de trabajo, se observó la gelificación en todas las concentraciones de endotoxinas establecidas pero los controles arrojaron los resultados esperados.

Tomando como punto de referencia los resultados de los controles se puede determinar que el agua apirógena, la endotoxina y el reactivo LAL no presentan alguna alteración que interfiera en la reacción ya que

el control negativo arrojó resultados que indican la ausencia de endotoxinas en el agua apirógena, en el control positivo la concentración de endotoxina de 0.5 UE/ml reaccionó con el reactivo LAL manteniendo su actividad y finalmente el control positivo a producto determinó que la dilución de trabajo 1:200 permitió la reacción de gelificación en presencia de una concentración de endotoxina de 0.5 UE/ml y el reactivo LAL.

Con los resultados obtenidos en el segundo sub lote en donde se observó gelificación en todas las concentraciones realizadas desde 0.5 hasta 0.06 UE/ml, se puede presumir mas no afirmar que este sub lote contiene endotoxinas en una concentración inferior al límite permitido en el producto ya que al no realizarse los ensayos preliminares para este segundo sub lote no se pudo determinar si contenía endotoxinas bacterianas o presentaba alguna interferencia.

Al igual que el segundo sub lote, en el tercer sub lote, también se observó la gelificación en todas las concentraciones en la primera réplica, por lo cual se puede presumir mas no afirmar que este sub lote contiene endotoxinas bacterianas en una concentración inferior al límite permitido en el producto ya que al no realizarse ensayos preliminares para este tercer sub lote no se pudo determinar si el lote del producto contenía endotoxinas o presentaba alguna interferencia; también se puede decir que durante la realización de la cuarta réplica del lote existió algún error humano en la manipulación por parte del operario o en el material utilizado que generó falsos negativos en todas las concentraciones.

Pudo presentarse un error al haber escogido la dilución de trabajo 1:200 para los tres lotes, debido a que ésta subestima un rango de endotoxinas (50 UE/ml) muy bajo con respecto al límite de endotoxinas per-

mitido en el producto (175 UE/ml). Es aconsejable realizar suficientes diluciones hasta llegar a la MDV para observar el comportamiento del producto y poder tener criterio al seleccionar una dilución que no sobrepase la MDV y que me permita disminuir el grado de error en las pruebas de rutina para llegar a resultados estadísticamente confiables dentro del rango de sensibilidad y la desviación estándar establecidos en la guía de la USP XXVI.

Para la estandarización de la prueba se tuvo en cuenta el rango de especificidad, en este caso se tomó como rango las diluciones de los ensayos preliminares Spike don no se presentó interferencia hasta la máxima dilución válida. La especificidad y selectividad del método se evaluaron con los ensayos preliminares, donde se determinó por medio de las diluciones la no interferencia de excipientes u otros factores en el producto. Tomándose una dilución en la cual estos factores no interfieran en los resultados de la prueba.

Por último la robustez y reproducibilidad del método fue dada por la manera como se realizó el ensayo, se tomaron tres lotes diferentes, de cada lote se tomaron tres muestras y se hizo un pool para cada valoración, además cada pool de muestras se trabajo en días y horas distintas. La confiabilidad de que el método se realizó correctamente se vio reflejado en los controles que se le aplicaron durante todo el proceso, los cuales siempre dieron los resultados esperados, controles negativos y controles positivos, asegurando así que se siguieron todos los pasos adecuadamente.

CONCLUSIONES

- Se valoró la presencia de endotoxinas bacterianas en penicilina G sódica y ranitidina inyectable por la prueba de Lisado del Amebocito de *Limulus* (LAL) por el método de gelificación obtenien-

do como resultado la máxima dilución válida y la dilución de trabajo.

- Se implementaron las condiciones para la estandarización de la prueba de Lisado del Amebocito de *Limulus* (LAL) para la valoración de endotoxinas bacterianas por el método de gelificación, dentro de las cuales se incluyen: la verificación del rótulo, la calificación del operario, la dilución de trabajo para los ensayos de rutina, el rango de pH de 6.0 a 9.0; la temperatura y tiempo de incubación 37 +/- 1°C durante un período de 1 hora +/- 2 minutos.
- Se determinó que la máxima dilución válida (MDV) para el producto inyectable penicilina G sódica 1:400 y ranitidina 1:700 con un límite de endotoxina de 100 UE/ml y 175 UE/ml respectivamente.
- Se comprobó la sensibilidad del reactivo de Lisado del Amebocito de *Limulus* (LAL) de 0.25 UE/ml.
- Con los ensayos preliminares Spike y Unspike se establecieron las diluciones de trabajo 1:100 para penicilina y 1:200 para ranitidina.
- Se comprobó que el método de gelificación empleado para la detección de endotoxinas es eficaz, confiable, rápido de fácil ejecución e interpretación y además no requiere un equipo muy costoso o sofisticado.
- Se calificó al operario con el fin de capacitarlo y así poder obtener resultados confiables.
- Se elaboró el protocolo general y el procedimiento particular para implementar el método de endotoxinas bacterianas para los productos penicilina G sódica y ranitidina tomando como acciones

correctivas las recomendaciones hechas en este trabajo de grado para uso exclusivo de la empresa.

LITERATURA CITADA

- AGUDELO M., C.M. 1999. *Valoración de endotoxinas bacterianas en sueros antiofídicos de origen equino: optimización de métodos en el control de calidad*. Tesis de posgrado. Universidad Nacional. Bogotá, Colombia.
- AGUDELO, C.M.; ARIAS, J. 2001. "Detección de pirógenos". *Laboratorio Actual*, 34: 17-23.
- Associates of Cape Cod Inc. 1996. *Preliminary testing*. LAL UPDATE, 14 (1): 1-5.
- Associates of Cape Cod Inc. 1997. *Routine testing and retest*. LAL UPDATE 15 (2): 1-4.
- BANG, F.B. 1956. *A bacterial disease of Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hosp*: 98: 325.
- BENNET, I.L.; PETERSDORF, R.F.; KEENE, W.R. 1957. *Pathogenesis of fever: evidence for direct cerebral action of bacterial endotoxin*. *Trans Assoc Am Phy* 70: 64-69.
- British Pharmacopoeia. 2000. "Test for bacterial endotoxins". London, vol. II, Appendix C-A243.
- COOPER, J.F.; LEVIN, J.; WAGNER, H.N. 1970. *New, rapid, in vitro test for pyrogen in short-lived radiopharmaceuticals*. *J Nucl Med* 11: 310-313.
- COOPER, J.F.; LEVIN, J.; WAGNER, H. 1971. *Quantitative comparison of in vitro (Limulus) and in vivo (Rabbit) methods for the detection of endotoxin*. *J Lab Clin Med* 78: 138-145.

- COOPER, J.F.; HOCHSTEIN, H.D.; SELIGMANN, E.B. Jr. 1972. *The limulus test for endotoxin (Pyrogen) in radiopharmaceuticals and biologicals*. Bull Parenter Drug Assoc 1 26 (4): 153-162.
- COOPER, J.F. 1975. *Principles and applications of the Limulus test for pyrogen in parenteral drugs*. Bull Parenteral Drug Assoc 29 (3): 122-130.
- COOPER, J.F. 1997. *Choice of regression analysis for kinetic LAL methods*. LAL Times 4 (1): 1-4.
- COOPER, J.F. 1999. *Validation of bacterial endotoxins test methods*. LAL Times 6 (2): 1-7.
- CHITTY, N.B. 1991. *LAL-5000 Series 2 automatic endotoxin detection system*. LAL Update 9 (1): 1-4.
- DAWSON, M.E. 1995. *A wealth of options. Choosing a LAL test methods*. LAL Update 13 (3): 1-5.
- DAWSON, M.E. 1996. *Preliminary testing*. LAL Update 14 (1): 1-5.
- DAWSON, M.D. 1993. *Endotoxin standards and CSE potency*. LAL Update 1993; 11 (4): 2-5.
- DAWSON, M.D. 1997. *Harmonization of endotoxin standards and Units*. LAL Update 15 (4): 2-3.
- GOULD, M.J. 1998. *Limulus amebocyte lysate assays and filters applications*. En: Meltzer T.H., Jornitz M.W. (eds.), *Filtration in the Biopharmaceutical Industry*. New York: Marcel Dekker; Págs 605-618.
- Guideline on validation of the *Limulus* amebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral Drugs, 1983. *Biological products and medical devices*. U.S. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Food and Drugs Administration. January.
- HOCHSTEIN, H.D.; ELFIN, R.J.; COOPER, J.F.; SELIGMAN, E.B. JR, WOLFF, S.M. 1973. *Further developments of Limulus amebocyte lysate test*. Bull Parenteral Drug Assoc 27 (3): 139-148.
- HOCHSTEIN, H.D.; FIZGERALD, E.A.; MCMAHON, F.G.; VARGAS, R. 1994. *Properties of US Standard (EC-5) in human male volunteers*. J Endotox Res 1: 52-56.
- IWANAGA, S. 1993. *The limulus clotting reaction*. Curr Opin Immunol 5: 74-82.
- IWANAGA, S. 1993. *Primitive coagulation systems and their message to modern biology*. *Thrombosis Haemostasis* 70 (1): 48-55.
- LEVIN, J.; BANG, F.B. 1964. *The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood*. Bull Johns Hopkins Hosp 115: 265-270.
- LEVIN, J.; BANG, F.B. 1968. *Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin*. *Thromb Diath Haemorrh* 19: 186-190.
- LEVIN, J. 1987. *The Limulus amebocyte lysate test: perspectives and problems*. En: Watson S.W.; Levin, J.; Novitzky, T.J. (eds.), *Detection of bacterial endotoxin with the Limulus amebocyte lysate test*. New York: Alan R. Liss; 1-23.
- MASCOLI, C.C.; WEARY, M.E. 1979. *Applications and advantages of the Limulus amebocyte lysate (LAL) pyrogen test for parenteral injectable products*. Prog Clin Biol Res 29: 387-402.

- MASCOLI, C.C.; WEARY, M.E. 1979. *Limulus amoebocyte lysate (LAL) test for detecting pyrogens in parenteral injectable products and medical devices: advantages to manufacturers and regulatory officials*. J Parenter Drug Assoc 33 (2): 81-95.
- NOVITSKY, T.J. 1991. Discovery to commercialization: the blood of the horseshoe crabs. *Oceanus* 27 (1): 13-18.
- PEARSON, F.C. Microbial pyrogen. 1985. En: Pearson, F.C. (eds.), *Endotoxins, LAL testing, and depyrogenation*. New York: Marcel Dekker 23-73.
- POOLE, S.; DAWSON, P.; GAINES, R.E. 1997. *Second international standard for endotoxin: calibration in an international collaborative study*. J Endotox Res 4 (3): 221-231.
- SHUSTER, C.N. 1990. The American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. En: Prior, R.B. (eds.), *Clinical applications of the Limulus amoebocyte lysate test*. Boston: CRC Press; 15-25.
- SUFFREDINI, A.F.; O'GRADY, N.P. 2000. Pathophysiological responses to endotoxins in humans. En: Brade, H.; Opal, S.M.; Vogel, S.N.; Morrison, D.C. (eds.), *Endotoxin in health and disease*. New York: Marcel Dekker 817-830.
- WEARY, M.A.; PEARSON, F.C. 1988. *Manufacture's guide to depyrogenation*. *Biopharm*; April: 24-29.
- TWOHY, C.W.; DURAN, A.P.; MUNSON, T.E. 1984. *Endotoxin contamination of parenteral drugs and radiopharmaceuticals as determined by the Limulus amoebocyte lysate method*. J Parenteral Sci Technol 38 (5): 190-200.
- WEARY, M.E. 1990. *Understanding and setting endotoxin limits*. J Parent Sci Technol. 44 (1): 16-18.
- WEARY, M.E. 1984. *Pyrogen testing of parenteral products-status report*. J Parent Sci Technol 38 (1): 24-29.
- WEARY, M.E. 1985. Depyrogenation. En: Pearson, F.C. (eds.), *Pyrogens: endotoxins, LAL testing and depyrogenation*. New York: Marcel Dekker; 203-218.
- Recibido: 09.07.2005
Aprobado: 14.03.2006