



# Propuesta para la estandarización de endotoxinas bacterianas y pirógenos en dos productos farmacéuticos parenterales por los métodos del lisado de amebocitos de *Limulus* y la prueba de activación de monocitos

Proposal for the standardization of bacterial endotoxins and pyrogens in two parenteral pharmaceutical products by the *Limulus* amoebocyte lysate and the monocyte activation test methods

ANDREA V. REQUENA<sup>a,1</sup>, MARLY SUÁREZ<sup>a,2</sup>, MARIED ROJAS<sup>a,3</sup>, ANA CARVAJAL<sup>\*a,4</sup>, ANA AGATÓN<sup>b,d,5</sup>, GENNY URQUÍA<sup>a,b,6</sup>, HEISEL UROSA<sup>a,b,7</sup>, IDAMELIS RODRÍGUEZ<sup>a,b,8</sup>, MARÍA ISABEL CALDERÓN<sup>a,b,9</sup>, CRICELIS MARTÍNEZ<sup>a,10</sup>, MICHAEL R. MUJARES<sup>a,b,c,11</sup>

## Resumen

La detección de pirógenos en productos parenterales es de suma importancia en la industria biotecnológica, la industria farmacéutica, los laboratorios de control de la calidad y agencias regulatorias. Los pirógenos son sustancias que provocan fiebre y no se eliminan mediante los procesos de esterilización estándar, siendo biológicamente activos una vez que se encuentran en el torrente sanguíneo, lo que provoca riesgos para la salud humana, que van desde reacciones leves (por ejemplo, fiebre) hasta shock séptico y muerte. Por lo tanto, la prueba de pirógenos es obligatoria para las formulaciones de fármacos y biotecnológicos inyectables, terapias celulares y diversos dispositivos médicos. Las pruebas de pirógenos son ensayos de seguridad realizados durante el control de calidad de rutina de los productos inyectables exigidos por las agencias reguladoras. Entre dichas pruebas de pirógenos se encuentran: 1) la Prueba de Endotoxinas Bacterianas (BET, LAL) y 2) Los sistemas de prueba que utilizan sangre total humana o monocitos humanos, denominada Prueba de Activación de Monocitos (MAT). En el presente trabajo se comparan las metodologías a seguir de los ensayos LAL gel clot, LAL cromogénica y MAT para la estandarización de pirógenos incluyendo las EB en dos productos farmacéuticos parenterales: penicilina G sódica y ranitidina inyectable.

**Palabras clave:** Endotoxinas bacterianas, pirógenos, penicilina G, ranitidina inyectable, Lisado de Amebocitos del *Limulus* (LAL), prueba de activación de monocitos (MAT)

## Abstract

The detection of pyrogens in parenteral products is of great importance in the biotechnology industry, the pharmaceutical industry, quality control laboratories, and regulatory agencies. Pyrogens are substances that cause fever and are not removed by standard sterilization processes, being biologically active once in the bloodstream, causing risks to human health, ranging from mild reactions (for example, fever) to septic shock and death. Therefore, pyrogen testing is mandatory for injectable drugs and biotech formulations, cell therapies, and various medical devices. Pyrogen tests are safety tests performed during routine quality control of injectable products required by regulatory agencies. Such tests for pyrogens include: 1) Bacterial Endotoxin Test (BET, LAL) and 2) Test systems using human whole blood or human monocytes, called the Monocyte Activation Test (MAT). This work compares the methodologies to be followed by LAL gel clot, chromogenic LAL, and MAT assays for the standardization of pyrogens, including BET in two parenteral pharmaceuticals: sodium penicillin G and injectable ranitidine.

**Keywords:** Bacterial endotoxins, pyrogens, sodic penicillin G, ranitidine, *Limulus* Amoebocyte Lysate (LAL), Monocyte Activation Test (MAT)

<sup>a</sup>Cátedra de Microbiología Aplicada, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, 47206, Los Chaguaramos 1041-A, Caracas, Venezuela. <sup>b</sup>Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, 47206, Los Chaguaramos 1041-A, Caracas, Venezuela. <sup>c</sup>Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, 50109, Los Chaguaramos 1050-A, Caracas, Venezuela. <sup>d</sup>Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Caracas, Venezuela. \*Correspondencia: anestella.carvajal@gmail.com.

Orcid: <sup>1</sup>[0000-0001-9762-1767](https://orcid.org/0000-0001-9762-1767)

<sup>6</sup>[0009-0002-3200-0112](https://orcid.org/0009-0002-3200-0112)

<sup>11</sup>[0000-0002-0055-2804](https://orcid.org/0000-0002-0055-2804)

<sup>2</sup>[0000-0001-8106-2905](https://orcid.org/0000-0001-8106-2905)

<sup>7</sup>[0009-0002-3173-2135](https://orcid.org/0009-0002-3173-2135)

<sup>3</sup>[0000-0001-8117-6961](https://orcid.org/0000-0001-8117-6961)

<sup>8</sup>[0000-0002-7467-0926](https://orcid.org/0000-0002-7467-0926)

<sup>4</sup>[0000-0002-1546-3337](https://orcid.org/0000-0002-1546-3337)

<sup>9</sup>[0000-0002-2094-8638](https://orcid.org/0000-0002-2094-8638)

<sup>5</sup>[0009-0008-4228-1409](https://orcid.org/0009-0008-4228-1409)

<sup>10</sup>[0000-0002-8204-0174](https://orcid.org/0000-0002-8204-0174)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.6](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.6)

Disponible: [http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_ff](http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff)

Recepción: 00/00/2023

Aprobación: 00/00/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(1y2): 44-55. 2023

## Introducción

Los pirógenos son compuestos inductores de fiebre tras su administración intravenosa o inhalación. Se originan a partir de las bacterias Gram negativas y positivas, los virus, hongos o del propio hospedador (Dullah y Ongkudon, 2017, Prajitha et al., 2018). Los pirógenos externos se clasifican en dos grandes grupos: pirógenos endotóxicos o endotoxinas bacterianas (EB), los cuales provienen de bacterias Gram negativas, y pirógenos no endotóxicos (NEP), derivados principalmente de bacterias Gram positivas y hongos. La presencia de cualquiera de ellos en productos farmacéuticos parenterales o dispositivos médicos puede causar daños graves a los pacientes y, cuando las EB y los NEP se encuentran simultáneamente pueden producir efectos sinérgicos (Solati y col., 2022).

### PRUEBA DEL LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS (LAL)

La Prueba del Lisado de Amebocito de Limulus (LAL) es un método para la detección y cuantificación de endotoxinas bacterianas ampliamente utilizado por la industria farmacéutica y biotecnológica, para la determinación de la seguridad de los medicamentos parenterales y de los dispositivos médicos (Ding y Ho, 2010). Su principio bioquímico se basa en la reacción de coagulación entre el factor C procedente de los extractos de amebocitos de la sangre de la hemolinfa de *Limulus polyphemus* o cangrejo herradura del Atlántico, en presencia de antígenos de superficie microbiana como los lipopolisacáridos del orden de los picogramos o endotoxinas bacterianas (Akbar y col., 2012). En presencia de endotoxinas, el LAL se vuelve turbio y, bajo las condiciones adecuadas,

forma un coágulo de gel sólido (Ding y Ho, 2010). Este ensayo fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 1983 como un método confiable para la determinación de las EB (Munson, 1985). Las pruebas o los ensayos LAL o BET se basan en una reacción de coagulación entre el factor C procedente de los extractos de amebocitos de la sangre del *Limulus polyphemus* o del cangrejo herradura *Tachypleus tridentatus* (ambas especies están en peligro de extinción) en presencia de cantidades de LPS del orden de los picogramos (Akbar y col., 2012).

El ensayo de LAL se puede dividir en tres técnicas básicas: las técnicas de gel-clot, turbidimétricas y cromogénicas (WHO, 2020).

La técnica gel-clot, se basa en una solución de lisado que forma un gel en presencia de EB, siendo el método de referencia. Un resultado positivo o negativo de este método se obtiene mezclando la muestra con un lisado en un tubo de ensayo. Si la concentración de EB de la muestra es superior al límite de detección, se formará un coágulo de gel en el fondo del tubo (WHO, 2020).

Las otras dos técnicas para la prueba de LAL, a saber, las técnicas turbidimétrica y cromogénica, son métodos fotométricos para determinar cuantitativamente la concentración de EB. En el método cromogénico se mide la liberación de cromóforos de un péptido cromogénico adecuado debido a la reacción de las EB con el lisado o se determina la intensidad de fluorescencia después de la reacción. Las pruebas LAL turbidimétricas y cromogénicas son más precisas y sensibles que el método del coágulo de gel, aunque este último es

el más simple de llevar a cabo y es el más utilizado a nivel mundial (Yamamoto y col., 2020).

Entre las limitaciones del ensayo de LAL se encuentra, que es una prueba específica para el componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Por lo tanto, el ensayo LAL no es aplicable para muestras que contengan pirógenos provenientes de bacterias Gram positivas (Peterbauer y col., 2000). Adicionalmente, diversos componentes plasmáticos, entre ellos proteínas, pueden afectar la sensibilidad y especificidad del ensayo de LAL al neutralizar las EB (Harm y col., 2021).

Otra limitación importante en el ensayo de LAL se refiere a la presencia de las nanopartículas que a menudo interfieren con este ensayo creando una importante limitación para el desarrollo preclínico y el control de la calidad de los medicamentos formulados con nanotecnología y dispositivos médicos que contienen nanomateriales de ingeniería (Dobrovolskaia y col., 2010).

#### PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOCITOS (MAT)

La MAT fue concebida por primera vez como una alternativa a las pruebas RPT (Rabbit Pyrogen Test) y LAL por Poole y col. en la década de 1980 y se basa en el aislamiento de monocitos de sangre humana periférica y su incubación con una muestra analizada para determinar el contenido de pirógenos, para imitar la respuesta de la fiebre a los pirógenos *in vivo* (Poole y col., 1988). Los monocitos participan en la respuesta inmunitaria innata y expresan receptores tipo Toll que se unen a los pirógenos, lo cual estimula la liberación de citocinas proinflamatorias (p. ej., IL-6, IL-1 $\beta$  o TNF $\alpha$ ) que pueden

ser cuantificadas (Daniels y col., 2022). En consecuencia, la cantidad de citocinas proinflamatorias, IL-6 o IL-1 $\beta$  liberadas es una medida de la pirogenicidad de una sustancia (Duff y Atkins, 1982; EP: 2010). Este método puede detectar hasta 10 pg/mL de EB, e incluso menos usando sangre crioconservada. Dado que el MAT utiliza sangre humana, es posiblemente el método de detección de EB *in vitro* más ventajoso, ya que no involucra ningún producto animal (Daniels y col., 2022).

Aunque hay varias fuentes de células que puedan ser utilizadas en el ensayo de MAT, los monocitos comúnmente utilizados generalmente se derivan de la sangre entera humana, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y líneas celulares monocíticas (Daniels y col., 2022). Este método es muy sensible, rentable, no utiliza animales vivos o sus productos, y cada día está recibiendo una mayor aprobación de diversas agencias regulatorias a nivel internacional.

El MAT se convirtió en un método de la Farmacopea Europea en 2010 (EP 2.6.30) (EP: 2010). La monografía de la Farmacopea Europea describe tres métodos para el MAT y se puede usar sangre total PBMC, o líneas celulares monocíticas para cualquiera de estos métodos (Eperon y col., 1997).

El ensayo de MAT ha sido validado con éxito para la determinación de los pirógenos provenientes de EB y NEP de bacterias Gram positivas, virus y hongos, en diversos productos biológicos.

En línea con los esfuerzos globales para reducir el uso de animales en los ensayos de investigación y en las pruebas de control de la calidad, el MAT tiene el potencial de reemplazar la RPT. Finalmente,

es importante recordar que a pesar de las ventajas del MAT respecto al RBT y el LAL, la implementación exitosa de este ensayo de monocitos requiere de la optimización y validación del ensayo para cada producto de prueba de forma particular.

La penicilina G sódica (también llamada bencilpenicilina sódica) es un antibiótico betalactámico con actividad bactericida. Esta actúa inhibiendo la síntesis de la barrera de peptidoglicano de la pared celular bacteriana al unirse e inactivar a las enzimas involucradas en el proceso. Dicha interferencia genera una estructura osmóticamente inestable que provoca la muerte del patógeno mediada por autolisinas endógenas. (INHRR, 2022).

Por otra parte, la ranitidina es un antagonista competitivo del receptor H<sub>2</sub> de histamina. Inhibe la acción de la histamina sobre los receptores H<sub>2</sub> de las células parietales en el estómago, reduciendo con ello la secreción (tanto basal como estimulada) de ácido gástrico (INHRR, 2018).

El presente trabajo tiene como objetivo la revisión bibliográfica de los estudios realizados sobre la determinación de endotoxinas por los métodos Lisado de Amebocitos del Limulus LAL en su variante de gel-clot y cromogénica, y la prueba de activación de monocitos (MAT) para la determinación de endotoxinas bacterianas y pirógenos en dos productos farmacéuticos parenterales: penicilina G sódica y ranitidina inyectable. MAT en penicilina G sódica y ranitidina.

Para ello se procedió a 1. Confirmar la sensibilidad declarada para el reactivo de LAL y su Media Geométrica para el método de gel-clot. 2. Determinar la Máxima

Dilución Válida en los métodos de gel-clot y cromogénico. 3. Estandarizar la prueba de factores de interferencia en los métodos de gel-clot y cromogénico, y 4. Estandarizar la técnica y metodología para la prueba de activación de monocitos.

## Metodología

### 1. PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

La Farmacopea de los Estados Unidos (United States of Pharmacopeia, USP) establece para formulaciones con penicilina G sódica un contenido de endotoxinas de no más de 0,01 Unidades de Endotoxina USP por 100 Unidades de penicilina G; y para formulaciones con ranitidina inyectable, no más de 7,00 Unidades de Endotoxina USP por mg de ranitidina, respectivamente.

#### 1.1 Técnica de coagulación gel-clot

- Reactivos y soluciones: (Associates of Cape Cod Inc).
- Pyrotell® de sensibilidad 0,25 UE/mL
- Agua para Prueba de Endotoxinas Bacterianas
- Estándar de Referencia de Endotoxina USP (CSE) de *Escherichia coli* O113:H10: CSE de 0,5 µg/vial o 125 µg/vial

#### Confirmación de la sensibilidad del reactivo LAL

Se verifica la sensibilidad declarada en la etiqueta del lisado que se va a utilizar preparando una curva estándar de EB con al menos 4 concentraciones equivalentes a  $2\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $0,5\lambda$  y  $0,25\lambda$  (cada una por cuatriplicado).

Se preparan las soluciones de CSE, asumiendo que la sensibilidad del LAL es de  $\lambda=0,25\text{UE/mL}$  y la potencia del CSE sea igual a  $10\text{UE/ng}$ .

A cada concentración de EB se le agrega la misma cantidad de reactivo LAL (relación 1:1 o  $0,1\text{mL}:0,1\text{mL}$ ) y se deja incubar durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente se observa si hubo formación de un gel firme que permanece en su lugar después de invertir los tubos (resultado positivo) o si se observa un gel no firme o líquido transparente (resultado negativo).

La prueba se considera válida cuando la concentración más baja de las CSE presenta un resultado negativo en todas las pruebas repetidas.

Para proceder al cálculo de la media geométrica (MG), se debe verificar que todos los tubos de control negativo hayan dado resultados negativos para considerar la prueba como válida. De ser válida la prueba, se debe determinar el punto final, considerando como punto final a la última dilución en la cual se obtuvo resultado positivo.

La MG de la concentración en el punto final es la sensibilidad medida del Lisado (en  $\text{UE/mL}$ ), por lo que:

$$2\lambda \geq \text{MG} \geq 0,5 \lambda$$

Si la MG no difiere en más de un factor de 2 de la sensibilidad teórica, se puede decir que la sensibilidad del LAL cumple y se puede aprobar para la prueba de EB.

### **Cálculo de la Máxima Dilución Válida (MDV)**

La sensibilidad del reactivo LAL ( $\lambda$ ) para la técnica gel-clot declarada es  $0,25 \text{ UE/}$

$\text{mL}$ , el límite de endotoxina de la penicilina G sódica y la ranitidina es de  $0.01 \text{ UE}/100 \text{ UI}$  y  $7,00 \text{ UE/mg}$ , respectivamente. La concentración de la penicilina G sódica es de  $1.000.000\text{UI/mL}$  y de la ranitidina  $25\text{mg/mL}$ , por lo que se obtiene una máxima dilución válida (MDV) de 1:400 para la penicilina G sódica y 1:700 para la ranitidina.

### **Prueba de factores de interferencia**

Se debe efectuar la prueba de inhibición o potenciación en las soluciones de la muestra con una dilución menor que la MDV:

MDV penicilina G sódica: 1:400  $\rightarrow$  1:200

MDV ranitidina: 1:700  $\rightarrow$  1:350

La preparación de soluciones de la muestra para la prueba de Inhibición/potenciación para las técnicas de coagulación se realiza de acuerdo a la Tabla I.

Luego de preparada las soluciones, se debe mezclar un volumen del LAL reconstituido igual al volumen final de cada uno de los tubos de ensayo (relación 1:1 o  $0,1\text{mL}:0,1\text{mL}$ ) y se deja incubar durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ .

Esta prueba se considera válida cuando:

Solución A: No muestra ningún coágulo. Si la muestra sin endotoxina coagula, hay endotoxinas en el producto y la muestra está claramente no inhibida.

Solución B: La muestra con endotoxina debe coagular. Observar en qué dilución se comienza a coagular la muestra (esta dilución debe ser menor a la MDV).

**Tabla I.**

Preparación de Soluciones de Muestra para la Prueba de Inhibición/Potenciación para Técnica gel-clot

Solución	Solución a analizar	Factor de dilución	Concentración de endotoxina UE/ML	Número de réplicas
A	Diluciones de la muestra con LRW	1:1	N/A	4 c/u
		1:2		
		1:4		
		1:8		
		1:16		
		1:32		
		1:64		
		1:128		
		1:256		
B	Diluciones de la muestra con solución de endotoxina	1:2	2	4 c/u
		1:4		
		1:8		
		1:16		
		1:32		
		1:64		
		1:128		
		1:256		
C	2 / LRW	1	2	2 c/u
		1:2	1	
		1:4	0,5	
		1:8	0,25	
D	Control Negativo (LRW)	N/A	N/A	2 c/u

Solución C: Debe confirmar la sensibilidad declarada del reactivo LAL.

Solución D: No muestra ninguna reacción.

- Agua para prueba de EB: Agua Reactiva LAL (LRW).

- Ácido acético al 50%: prepararlo con LRW.

## 2. Técnica cromogénica

### Reactivos y soluciones

- Pyrochrome® de sensibilidad 0,005 UE/mL; Pyrochrome® Reconstitution Buffer; CSE USP de *Escherichia coli* O113:H10 de 0,5 µg/vial o 125 µg/vial (Associates of Cape Cod Inc).

### Determinación de la Curva Estándar

Se construye una curva estándar que represente la densidad óptica (DO) vs las concentraciones de CSE. La Sensibilidad declarada del PyroChrome® es =0,005 UE/mL y la potencia CSE es igual a 10UE/ng (1000UE/mL). Por recomendación del

fabricante, se preparan 5 concentraciones de CSE (R1 –R5): 0,005; 0,05; 0,5; 5 y 50 UE/mL.

Cálculo de la MDV: la sensibilidad declarada del reactivo LAL ( $\lambda$ ) para la técnica cromogénica es 0,005 UE/mL, el límite de endotoxina de la penicilina G sódica y la ranitidina es de 0,01 UE/100 UI y 7,00 UE/mg, respectivamente. La concentración de la penicilina G sódica es de 1.000.000UI/mL y de la ranitidina 25mg/mL, por lo que se obtiene una MDV de 1:20000 para la penicilina G sódica y 1:35000 para la ranitidina.

#### **Cálculo de la Concentración Mínima Válida (CMV):**

La dosis de muestra de la ranitidina es de 1mg/kg, por lo cual:

$$CMV=(0,005UE/mL) \times (1mg/kg) (5 UE/kg)=0,001mg/mL$$

La dosis de muestra de la penicilina G sódica es de 200.000 UI/kg, por lo cual:

$$CMV=(0,005UE/mL) \times (200.000UI/kg) (5 UE/kg)=200UI/mL$$

#### **Prueba para factores de interferencia**

Se debe efectuar la prueba de inhibición o potenciación en las soluciones muestra con una dilución menor que la MDV:

$$MDV \text{ penicilina G sódica: } 1:20000 \rightarrow 1:10000$$

$$MDV \text{ ranitidina: } 1:35000 \rightarrow 1:17500$$

La preparación de soluciones de la muestra para la prueba de inhibición/potenciación para técnicas fotométricas se realiza de acuerdo con la Tabla II.

La prueba se considera válida cuando el valor absoluto del coeficiente de correlación

de la curva estándar generada usando la solución C es mayor o igual a 0,980 y el resultado de la solución D no excede el límite del valor del blanco requerido en la descripción del lisado empleado como reactivo o es menor que el límite de detección de endotoxina del lisado empleado como reactivo.

#### **Procedimiento de la prueba**

Colocar por duplicado 0,05mL de las soluciones A, B, C y D en cada pocillo de una microplaca y transferir 0,05mL del reactivo LAL a todos los pocillos. Agitar durante 5 a 30 segundos todos los tubos e incubar la mezcla en baño de agua a  $37 \pm 1^\circ$  durante 60 minutos. Detener la reacción añadiendo 0,025mL de ácido acético al 50% a cada pocillo y medir la DO a 405nm en un lector de microplacas.

Calcular la concentración de EB de cada una de las determinaciones empleando la ecuación de la recta:

$$Y=aX + b \text{ reordenada como } X = (Y-b)/a$$

La prueba se considera válida cuando se cumplen las tres condiciones siguientes:

1. Los resultados de la solución C de control cumplen con los requisitos de validación definidos en Garantía de Criterios para la Curva Estándar.
2. La recuperación de EB, calculada a partir de la concentración encontrada en la solución B después de restar la concentración de EB encontrada en la Solución A está dentro del intervalo de 50%-200%.
3. El resultado de la solución D de control negativo no excede el límite del valor del blanco requerido en la descripción

**Tabla II.**

Preparación de Soluciones de Muestra para la Prueba de Inhibición/  
Potenciación para Técnicas fotométricas

Solución	Concentración de endotoxinas	Solución a la cual se le agrega endotoxina	Número de repeticiones
A	Ninguna	de penicilina G sódica	2
		de ranitidina	2
B	R3 = 0,5 UE/mL	de penicilina G sódica	2
		de ranitidina	2
C	R1 = 0,005 UE/mL	LRW	2
	R2 = 0,05 UE/mL	LRW	2
	R3 = 0,5 UE/mL	LRW	2
	R4 = 5 UE/mL	LRW	2
	R5 = 50 UE/mL	LRW	2
D	Ninguna	LRW	2

del lisado empleado o es menor que el límite de detección de endotoxina del lisado empleado como reactivo.

## 2. PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOCITOS

En la presente publicación se discute la metodología a seguir del método A para la estandarización de pirógenos en penicilina G sódica y ranitidina inyectable utilizando el sistema PyroMAT® que se basa en la línea celular Mono-Mac-6 y en la lectura de IL-6.

### Reactivos y soluciones

- Células PyroMAT® Mono-Mac-6 criopreservadas (MERCK).
- CSE con 10,000 UE liofilizada (MERCK).
- Kit PyroMAT™ (MERCK).
- Control de pirógenos no endotóxicos (NEP) HKSA (MERCK).

- IL-6 control (MERCK).
- Agua destilada.

Se prepara la solución estándar EB para obtener una concentración de 2000 UE/mL se utiliza como solución madre para preparar diluciones en serie.

A su vez, se prepara el control de NEP con una concentración resultante de 1000X, la cual se utiliza como solución madre para preparar diluciones en serie de 100X (spike), 10X y 1X (control positivo) que servirán para el análisis.

### Prueba de factores de interferencia

- Cálculo de la MDV: el límite de detección del sistema utilizado es 0,05 UE/mL, la Concentración Límite de Contaminantes, a (CLC) de la penicilina G sódica y ranitidina es 0,01 UE/100 UI y 7,00 UE/mg, respectivamente. En el mercado venezolano se encuentra la penicilina como polvo estéril para reconstituir la solución inyectable de 1.000.000 UI y la ranitidina como solución inyectable de 50 mg<sup>2</sup> mL. Se obtuvo para la penicilina un MDV de 1:2000 y para la ranitidina 1:3500.

Diluir la muestra de acuerdo con lo indicado en la sección de preparación de la muestra descrito. usar la curva de CSE para calcular la concentración de equivalentes de EB en cada solución. Calcular la recuperación media de la EB añadida restando la concentración media de equivalentes de la EB en la solución de la solución que contiene la EB añadida.

## **Metodología para el método A: Prueba cuantitativa:**

Se comparan las muestras de penicilina G sódica y ranitidina con una curva de dosis-respuesta de CSE que se medirá mediante un kit PyroMAT™ cuya sensibilidad es de 0,05UE/mL. Para hacer la curva se prepara una dilución de concentración 20UE/mL para utilizar como spike y como solución de partida para preparar las soluciones de EB a 7 concentraciones (R1-R7): 0,0125UE/mL, 0,025UE/mL, 0,05UE/mL, 0,1UE/mL, 0,2UE/mL, 0,4UE/mL y 0,8UE/mL. Los resultados de la curva serán aceptados si hay una regresión estadísticamente significativa de la respuesta medida en la concentración de CSE y la regresión de las respuestas sobre la dosis logarítmica no se desvía significativamente de la linealidad.

### **Preparación de la muestra**

- Muestra no contaminada: La muestra se analiza a 3 niveles de dilución que no superen la MDV. Las pruebas de factores de interferencia experimentales para la PEB plantearon que posibles diluciones de trabajo para la penicilina G sódica es 1:100, y para la ranitidina podría ser 1:200 (Carrillo y col., 2006). Resultando para la penicilina G sódica diluciones de 1:40 (f), 1:80 y 1:160; y para la ranitidina diluciones de 1:50 (f), 1:100 y 1:200.
- Muestra con la CSE como spike: Cada dilución de muestra se contamina con 0,2 UE/mL (Utilizando la solución de endotoxina a 20 EU/mL como spike).
- Muestra con NEP como spike: Solo la dilución 1 de la muestra se contamina con 1X de NEP (Utilizando la Solución 100X como spike).

El llenado de la placa se realiza agregando 50  $\mu$ L a cada pocillo con la curva estándar, las muestras y los controles. Una placa permite analizar 2 muestras, por lo que se dispondrá de la forma que se indica en la Tabla III.

### **Preparación de las células PyroMAT®**

Un vial de células es suficiente para la mitad de una placa de 96 pocillos, por lo cual se necesitarán 2 viales suspendidos en 20mL de medio de cultivo para realizar el análisis de las 2 muestras.

### **Llenado de la placa con cultivo celular de células PyroMAT®**

Dispensar 200  $\mu$ L de medio de cultivo con células por pocillo con una pipeta P1000 para evitar daños en las células.

### **Incubación de la placa**

Incubar la placa con cultivo celular durante  $22 \pm 2$  horas a 37 °C en una atmósfera húmeda sin CO<sub>2</sub>.

### **Detección de IL-6 por ELISA mediante el protocolo estándar**

Transferir 100  $\mu$ L/pocillo del sobrenadante celular a la microplaca ELISA. Añadir 200  $\mu$ L/pocillo del control de IL-6 e Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, vaciar la microplaca ELISA y añadir 400  $\mu$ L/pocillo de buffer de lavado, vaciar la microplaca ELISA, invertir y secar contra toallas de papel limpias (repetir este paso 3 veces más, para un total de 4 lavados).

Dejar el buffer de lavado en la placa mientras se prepara la solución de sustrato y se deja reposar por 15 minutos. Añadir 200  $\mu$ L/pocillo de solución de sustrato e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente,

**Tabla III.**

Preparación de las muestras, estándares y controles en Prueba de Activación de Monocitos (MAT)

	CURVA ESTÁNDAR				ANÁLISIS PENICILINA G SÓDICA				ANÁLISIS RANITIDINA			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco = 0 UE/mL (Agua LRW)				Dilución 1:40				Dilución 1:50			
B	R1 = 0,0125 UE/mL				Dilución 1:40 + spike RSE				Dilución 1:50 + spike RSE			
C	R2 = 0,025 UE/mL				Dilución 1:80				Dilución 1:100			
D	R3 = 0,05 UE/mL				Dilución 1:80 + spike RSE				Dilución 1:100 + spike RSE			
E	R4 = 0,1 UE/mL				Dilución 1:160				Dilución 1:200			
F	R5 = 0,2 UE/mL				Dilución 1:160 + spike RSE				Dilución 1:200 + spike RSE			
G	R5 = 0,4 UE/mL				Dilución 1:40 + spike NEP				Dilución 1:50 + spike NEP			
H	R7 = 0,8 UE/mL				Solución 1X de NEP							

protegido de la luz. Por último, agregar 50  $\mu$ L/pozo de solución de parada y mezclar completamente.

### Lectura de la microplaca

Medir la DO a 450 nm y 630 nm. La placa se puede leer dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

### Interpretación de los resultados

La muestra contiene NEP si la diferencia de señal entre la muestra con spike y la muestra sin spike, expresado en EEU/mL, está por encima del LOD = 0,05 EEU/mL.

Para cada dilución de muestra válida, la señal de OD se convierte en EEU/mL, se corrige con el factor de dilución y se compara con la Concentración Límite de Contaminantes (CLC) para concluir que la muestra analizada:

**Cumple:** Si el valor de EEU/mL en la muestra pura de penicilina G sódica es < 0,01 UE/100UI, o Si el valor de EEU/mL en la muestra pura de ranitidina es < 7 UE/mL

**No cumple:** Si el valor de EEU/mL en la muestra pura de penicilina G sódica es < 0,01 UE/100UI, o Si el valor de EEU/mL en la muestra pura de ranitidina es < 7 UE/mL.

### Conclusiones

Se realizaron los cálculos y revisión teórica para la estandarización de las pruebas de EB en dos soluciones estériles, penicilina G sódica y ranitidina inyectable por la prueba de LAL mediante el método de gelificación y el método cromogénico, además de la MAT.

Se discutieron los sistemas que existen en el mercado, como el Pyrotell®, Pyrochrome® y PyroMAT®.

Los métodos cuantitativos se emplean si satisfacen los requisitos para métodos alternativos, pero, en caso de discrepancias, el resultado obtenido con el método de gel clot en tubo es el definitorio.

El método de MAT es la única prueba de pirógenos realizada en una línea celular e imita la reacción inmunitaria humana, permite la determinación de endotoxinas provenientes de bacterias gram negativas, y además de NEP de bacterias gram positivas, levaduras, hongos, virus. El MAT permite la eliminación del uso de experimentación con animales.

## Recomendaciones

La realización de este proyecto pretendió ser una revisión bibliográfica de los estudios realizados sobre la determinación de endotoxinas por los métodos LAL y MAT en penicilina G sódica y ranitidina, por lo que se recomienda llevar a cabo los ensayos pertinentes para comprobar los análisis propuestos en el mismo.

## Agradecimientos

Agradecemos a los profesores de la Cátedra de Microbiología Aplicada de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, por colaborar en la realización de nuestro proyecto.

## Referencias

Akbar JB, Kamaruzzaman BY, Jalal KCA, Kasimm Z. 2012. TAL – a source of bacterial endotoxin detector in liquid biological samples. *Int Food Res J* 19:423-5.

Associates of CAPE COD Incorporated Specialists in Endotoxin and Glucan Detection. Pyrochrome® Chromogenic Endotoxin Testing Reagents. Available online: <https://www.acciusa.com/products-and-services/bet-products/lal-reagents/pyrochrome>.

Associates of CAPE COD Incorporated Specialists

in Endotoxin and Glucan Detection. Pyrotell® Gel-clot Formulation. Available online: <https://www.acciusa.com/products-and-services/bet-products/lal-reagents/pyrotell>.

Carrillo C, Ospina J, Aldana D, Arias J, Echeverri C. 2006. Valoración de endotoxinas bacterianas en Ranitidina y Penicilina G sódica inyectable mediante la prueba de Lisado del Amebocito de Limulus. *Universitas Scientiarum. Rev Facultad de Ciencias* 11(1):15-28.

Daniels R, Van der Elst W, Dieltjens N, Appels T, So CK, Nys T, Liesbeth Voeten L, Breugelmans P, Molenaar-de Backer MWA, Gitz E, Poole S, Patel M. 2022. Validation of the monocyte activation test with three therapeutic monoclonal antibodies. *ALTEX* 39(4):621-635.

Ding JL, Ho B. 2010. Endotoxin detection--from Limulus amebocyte lysate to recombinant factor C. *Subcell Biochem* 53:187-208.

Dobrovolskaia MA, Neun BW, Clogston JD, Ding H, Ljubimova J, McNeil SE. 2010. Ambiguities in applying traditional Limulus amebocyte lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations. *Nanomedicine (Lond)* 5(4):555-62.

Duff GW, Atkins E. 1982. The detection of endotoxin by in vitro production of endogenous pyrogen: comparison with limulus amebocyte lysate gelation. *J Immunol Methods* 52(3):323-31.

Dullah EC, Ongkudon CM. 2017. Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin-protein interactions. *Crit Rev Biotechnol* 37(2):251-261.

EP: 2010. 9.2, E.P. Chapter 2.6.30. Monocyte-activation test. Available online: <http://www.bravvam.fiocruz.br/wp-content/uploads/2022/05/MAT20630E-2017.pdf>

Harm S, Schildböck C, Strobl K, Hartmann J. 2021. An in vitro study on factors affecting endotoxin neutralization in human plasma using the Limulus amebocyte lysate test. *Sci Rep* 11(1):4192.

Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Sistema de Información de Medicamentos. Fichas farmacológicas: bencilpenicilina sódica, 2022. [http://inhrr.gob.ve/fichasfarma/archivos/20170104113147\\_4836.pdf](http://inhrr.gob.ve/fichasfarma/archivos/20170104113147_4836.pdf)

Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Sistema de Información de Medicamentos. Fichas farmacológicas: ranitidina 150mg y 300mg, 2018. [http://inhrr.gob.ve/fichasfarma/archivos/20180517093422\\_1974.pdf](http://inhrr.gob.ve/fichasfarma/archivos/20180517093422_1974.pdf)

Merck: 2019; PyroMAT™ System, Monocyte Activation Test (MAT). Available online: <https://www>.

- merckmillipore.com/VE/es/products/industrial-microbiology/pyrogen-testing/monocyte-activation-test/2cKb.qB.zawAAAE\_vQR3.Lxj,nav
- Munson TE. 1985. Guideline for validation of the LAL test as an end-product endotoxin test for human and biological drug products. *Prog Clin Biol Res* 189:211-20.
- Peterbauer A, Eperon S, Jungi TW, Werner ER, Werner-Felmayer G. 2000. Interferon-gamma-primed monocytoïd cell lines: optimizing their use for in vitro detection of bacterial pyrogens. *J Immunol Methods* 233(1-2):67-76.
- Poole S, Thorpe R, Meager A, Hubbard AR, Gearing AJ. 1988. Detection of pyrogen by cytokine release. *Lancet* 1(8577):130.
- Prajitha N, Athira SS, Mohanan PV. 2018. Pyrogens, a polypeptide produces fever by metabolic changes in hypothalamus: Mechanisms and detections. *Immunol Lett* 204:38-46.
- Solati S, Zhang T, Timman S. 2022. The monocyte activation test detects potentiated cytokine release resulting from the synergistic effect of endotoxin and non-endotoxin pyrogens. *Innate Immun* 28(3-4):130-7.
- USP: 2021; United States Pharmacopeia (USP). (151) Pyrogen test. In: USP 44/NF 39, U. S. Pharmacopeial Convention, Rockville, pp. 166e168.
- WHO 2020. World Health Organization. (3.5 Test for pyrogens) in: *The International Pharmacopoeia - Tenth Edition*, Geneva World Health Organization, Dept. of Essential Medicines and Pharmaceutical Policies, 2020a. <https://digicollections.net/phint/2020/index.html#p/home.3>
- Yamamoto A, Ochiai M, Fujiwara H, Asakawa S, Ichinohe K, Kataoka M, Toyozumi H, Horiuchi Y. 2000. Evaluation of the applicability of the bacterial endotoxin test to antibiotic products. *Biologicals* 28(3):155-67.