



## Determinación de endotoxinas bacterianas por el método cromogénico cinético en el inyectable Cefepima

### Determination of bacterial endotoxins for the kinetic chromogenic method in the injectable Cefepime

RAISA INÉS MEDINA BORGES<sup>1</sup>, ELIENER CUESTA GARCIARENA<sup>1</sup>, XIOMARA RAFAELA CISNEROS LAGUNA<sup>1</sup> y JOSÉ ARZOLA RUIZ<sup>2</sup>

#### RESUMEN

En el trabajo se evalúa el método de Lisado de Amebocitos del Limulus (LAL) en su variante cromogénica cinética para la determinación de endotoxinas bacterianas en el inyectable Cefepima ig. Se monitorea el desarrollo de color a través del tiempo y se emplea una curva estándar representada por el tiempo de reacción en función de la concentración de endotoxinas. Se realiza la caracterización del producto. La selección de la dilución de trabajo fue evaluada preliminarmente en el ensayo de inhibición y realce siendo ambas definidas. La dilución se validó en tres lotes consecutivos del producto y se observó en todos los casos porcentajes de recobrados enmarcados dentro de los límites establecidos. Se demostró que la estandarización y validación del método permite su aplicación como ensayo de rutina para la determinación de endotoxinas bacterianas como parte del control de calidad de este producto.

**Palabras clave:** endotoxinas; validación del ensayo; lisado de amebocitos del limulus.

<sup>1</sup> Empresa Farmacéutica "8 de Marzo". Biocubafarma. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría. La abana, Cuba.

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Aporte Santiaguino de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4,0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

## **ABSTRACT**

In the present work the Lal method in its kinetic chromogenic variant for the determination of bacterial endotoxins in the injectable Cefepime 1 g is evaluated. The objective of this variant consists in the control of the color development through the time and it uses a standard curve represented by the reaction time as function of the known concentration of endotoxins. The characterization of the product was carried out. The selection of the dilution of work was preliminarily evaluated in the inhibition and rehearsal assay. The elected dilution was validated in three serial lots of the product and it was observed, in all the cases, recovered percent framed inside the established limits. It was demonstrated that the standardization and validation of the method allow its application as routine assay for the determination of bacterial endotoxins as a part of the quality control for this product.

**Keywords:** endotoxins; validation of endotoxins assays; lisado of amebocitos of the limulus.

## **INTRODUCCIÓN**

Las endotoxinas bacterianas son principalmente Lipopolisacáridos (LPS) que se localizan exclusivamente en la membrana externa de las bacterias gram negativas (Perdomo, 2004). Los *Limulus polyphemus* son uno de los animales que más años han sobrevivido en la tierra, sus orígenes datan de hace más de 200 millones de años. Este animal es muy resistente, pero experimenta coagulación en su hemolinfa (Lewn et al., 1964).

Los productos parenterales se diferencian de los demás por su alto grado de pureza y por estar libres de contaminantes físicos, químicos y biológicos, ya que la presencia de cualquiera de estos puede afectar no solo la vida útil del fármaco sino también la salud del paciente, por lo que involucra una serie de operaciones y controles rigurosos orientados a obtener un producto que cumpla tales especificaciones, según se establece en la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica. (USP 40-NF 35, 2017) y en las Regulaciones del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos y Equipos Médicos (CECMED). (Buenas Prácticas Farmacéuticas, 2017). Al descubrirse este hecho en la década de los 60, se continuaron las investigaciones hasta lograr aprovechar esta reacción para realizar ensayos in vitro de detección de endotoxinas en diferentes medios. Los *Limulus polyphemus* pertenecen al grupo de los cangrejos herradura, también se les conoce como cangrejo bayoneta o cangrejo cacerola; habita en la costa atlántica

de la parte norte del continente americano, incluyendo el Golfo de México (Lewn et al., 1964).

El método 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 hace que se forme un gel visible y consistente. Como parte del control de calidad de los productos farmacéuticos, la USP establece la cuantificación de endotoxinas bacterianas por el método LAL, como monitor de pirógenos para más del 90 % de los parenterales que regula.

Las Cefalosporinas son fármacos con acción antimicrobiana, las cuales se clasifican dentro de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro. Su mecanismo de acción es inhibir las síntesis de la pared celular de bacterias gram positivas y gram negativas (Albarelos et al., 2014; Wikipedia, 2014).

La Cefepima es un antibiótico del grupo de las cefalosporinas de cuarta generación, desarrollado en 1994. Su espectro de acción es similar al de las cefalosporinas de tercera generación, con propiedades bactericidas sobre microorganismos gram positivos, gram negativos y enterobacteriáceas, como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Providencia*, *Serratia*, *Morganella* (Rivas et al., 2002).

El mecanismo de acción de la Cefepima, cuya fórmula se muestra en la figura 1, como para el caso general de las cefalosporinas, consiste en inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, a la que se une por su alta afinidad con las PBP 3 (Proteínas Ligadoras de Penicilina). Este antibiótico muestra más actividad frente a cocos gram positivos, resulta efectiva sobre cepas productoras de betalactamasas como *Enterobacteriaceae*, responsables de sepsis graves, resistentes a los antibióticos tradicionales. Está indicada para el tratamiento de infecciones de vías respiratorias inferiores (incluyendo, eventualmente, neumonía y bronquitis) y vías urinarias (Núñez, 2014).

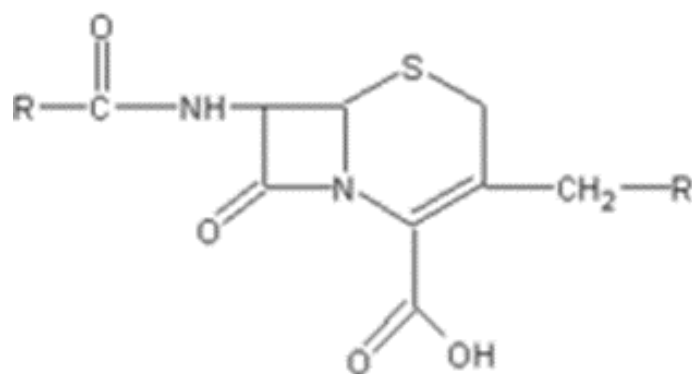


Figura 1. Fórmula semidesarrollada de la Cefepima

La Empresa Farmacéutica "8 de Marzo", ubicada en La Habana, Cuba, se dedica a la producción de antibióticos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos; entre ellos, la Cefepima, polvo estéril para inyección, de cuarta generación.

Los principales organismos nacionales e internacionales, encargados de regular la elaboración de productos farmacéuticos, exigen cada vez más en sus protocolos de calidad la aplicación del ensayo para la determinación de endotoxinas bacterianas en productos inyectables. El objetivo de este trabajo consiste en validar el ensayo del producto Cefepima 1g inyectable por el método LAL, en su variante cromogénica, para la determinación de endotoxinas bacterianas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras utilizadas para la validación de la dilución de trabajo corresponden a los lotes a escala de laboratorio del producto Cefepima 1g: L-6010, L-6011, L-6012. Para el ensayo se utiliza el Agua reactivo LAL (LRW, por sus siglas en inglés) y el Kit de lisado de Amebocitos de Limulus PYROCHROME: Envase que contiene el reactivo LAL, su solución Buffer de reconstitución y el Control Estándar de Endotoxinas. Este Kit está formado por Reactivo LAL Pyrochrome; envasado en bulbos en forma liofilizada, contiene un extracto acuoso de Amebocitos de *Limulus polyphemus*, estabilizante, sales, tampón, y un sustrato cromogénico, compuesto por una mezcla de diversos aminoácidos y p-nitroanilina. El Reactivo LAL Pyrochrome no tiene una sensibilidad específica asignada. La sensibilidad en un análisis dado ( $\lambda$ ) es la concentración de

endotoxinas más baja utilizada para elaborar la curva estándar. Su máxima sensibilidad es de 0,005 UE/mL. (Associates of Cape Cod Inc. Manual de Instrucción del Test LALPyrotell®, 2011).

Las muestras se incubaron a 37 °C en un equipo Lector Cinético de tubos, PyrosKinetix Flex (que tiene incorporado el software Sistema Automatizado de Control y Adquisición de Datos: PyrosEQS), el cual procesa los datos de las muestras y monitorea el desarrollo de color amarillo a través del tiempo. Cuanto mayor sea la concentración de endotoxinas en la muestra más rápidamente se produce la p-nitroanilina, sustancia amarilla, a una absorbancia de 405 nm.

### **Preparación de la curva estándar**

Se utiliza 4 tubos de centrifuga eppendorf de 15 ml para la curva estándar con soluciones a concentraciones de 5; 0,5; 0,05 y 0,005 UE/ml respectivamente. A estos se le añade 900 µL de agua reactivo LAL. Se reconstituye el vial de Endotoxina Estándar adicionándole la cantidad de agua LAL según la especificación del certificado del fabricante. Se agita en vortex durante 1 min, previamente tapada la boca del vial con papel parafilm. Luego de la reconstitución, si la concentración de endotoxina, según certificado del fabricante, es de 50 UE/mL, se toman 100 µL y se transfiere al bulbo rotulado con la concentración 5, quedando a una concentración final de 5UE/mL. Si la concentración de endotoxinas, en el certificado del fabricante, no es 50 UE/mL, realice el cálculo de una dilución que le permita llevarla a 50 UE/mL.

Se preparan diluciones seriadas 1:10 a partir de la concentración de 5 UE/mL. Para ello se tomaron 100 µL del bulbo rotulado con 5 UE/ml, se añade al bulbo rotulado con 0,5 UE/ml y así sucesivamente hasta llegar a la concentración 0,005 UE/mL, siempre agitando en el vortex, durante un minuto, al pasar de una dilución a otra. (British Pharmacopoeia, 2009).

### **Preparación de la muestra**

Se toman muestras correspondientes al inicio, mediados y final de cada lote. Para el ensayo se combina el contenido de tres bulbos de cada lote para formar una muestra homogénea en tubos eppendorf, apirogénicos, y se adiciona a cada uno 10 mL de agua reactivo LAL. Los bulbos se agitan hasta su total reconstitución. Se realizan diluciones decimales seriadas de la muestra

desde 1: hasta 1:1000, sin llegar a sobrepasar la máxima dilución válida (MVD) del producto. Para ello se añaden 100  $\mu\text{L}$  de la muestra y 900  $\mu\text{L}$  de agua LAL, siempre agitándose en el vortex, durante un minuto, al pasar de una dilución a otra.

### **Preparación del reactivo LAL**

El vial de Pyrochrome se golpea ligeramente para que el contenido se deposite en el fondo del mismo. Se retira y desecha el tapón. Reconstituido el vial de Pyrochrome con 3, 2 mL del bulbo que contiene la solución buffer-sustrato, se agita suave para asegurar la homogeneidad, pero evite hacerlo con demasiada brusquedad para evitar que se forme demasiada espuma y pérdida de sensibilidad. Se deja reposar el reactivo por 3 min antes del uso. (Baird R., 1988).

### **Estandarización del ensayo LAL**

La estandarización del ensayo LAL incluye la calificación del analista y los ensayos preliminares. (Osorio, et al., 2007). La calificación del analista se realiza teniendo en cuenta la destreza del mismo para realizar la curva estándar. Se evalúan diferentes concentraciones de un control estándar de endotoxinas por cuadruplicado con el reactivo LAL. Para esto se parte del vial de 5 UE/mL y se realizan diluciones seriadas en tubos eppendorf para obtener cuatro concentraciones de endotoxina, (5; 0, 5; 0, 05; 0, 005 UE/mL), se utiliza durante 1 minuto el mezclador vortex entre una y otra dilución. Se establecen los criterios de aceptación: coeficiente de correlación ( $r$ )  $\geq 0,98$  y coeficiente de variación entre las réplicas  $\leq 10\%$ .

Los ensayos preliminares incluyen la determinación de pH, la caracterización del producto y el ensayo de inhibición o realce para seleccionar la dilución de trabajo (Dawson, 1996). Para la caracterización del producto se determina la MVD que permite detectar el límite de endotoxinas que se le puede hacer a una muestra y las endotoxinas presentes en la misma. Para realizar el cálculo de la MVD se emplea el límite de endotoxinas reportado para el producto en estudio, según la USP, teniendo en cuenta la sensibilidad del reactivo. El cálculo de la MVD se realiza según se expresa a continuación:

$$MVD = LCE(UE/mL)$$

*Determinación de endotoxinas bacterianas por el método cromogénico cinético en el inyectable Cefepima*

Donde:

LCE = Límite de concentración de endotoxinas bacterianas reportado para la Cefepima igual a 0,06 UE/mg. La menor concentración de LAL ( $\lambda$ ) en la curva patrón es de 0,005 UE/mL. Potencia del producto 200 mg/ml Masa dosificada /volumen de agua para reconstituir: 1000 mg /5 ml = 200 mg/ml

Si el LCE se reporta en UE/mg, entonces se convierte a UE/mL. Para ello se multiplica el LCE por la potencia del producto o concentración de la muestra en el ensayo (mg/mL).

### **Ensayo de Inhibición o realce**

Las pruebas de inhibición o realce se realizan, para validar el método LAL aplicado a la muestra en ensayo, demostrando que la muestra no interfiere con la habilidad del método para detectar endotoxinas. Las pruebas de inhibición o realce son precedidas por las pruebas preliminares para poder determinar la concentración y dilución en la cual el producto no interfiere.

Se evalúa la dilución óptima seleccionada en el ensayo de interferencia en los 3 lotes de producto con su correspondiente control positivo y se calcula el porcentaje de recuperación de la endotoxina añadida. Se selecciona como dilución óptima de trabajo, aquella en la cual el porcentaje de recobrado (% R) del control positivo está comprendido entre 50 y 200 % de la concentración nominal de endotoxina añadida, o sea, no hay inhibición ni incremento, por tanto, es con esta dilución donde se eliminan las interferencias del producto con la técnica, sin exceder el MVD.

La validación de la técnica se realiza según los resultados obtenidos en los ensayos preliminares (dilución de trabajo). Se preparan diluciones del producto por cuadruplicado, de los tres lotes diferentes del producto Cefepima 1g. Se establecen los criterios de aceptación: coeficiente de correlación de la curva ( $r$ )  $\geq 0,98$  % de recobrado (% R) de la muestra marcada entre 50 – 200 y el coeficiente de variación entre las réplicas  $\leq 20$  %. (Burguet et al., 2012; FDA, 1987).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realiza la determinación de endotoxinas bacterianas en el producto Cefepima 1g inyectable por el método LAL, en su variante cromogénico cinético.

En la tabla 1 se observan los datos del reporte, dados por el equipo, PyrosKinetix Flex; se cumplen con precisión los parámetros certificados y establecidos para la lectura de la curva y los resultados del tiempo de reacción frente al control estándar de endotoxina, expresado en UE/ml. Se demuestra que la curva estándar cumple con el coeficiente de correlación establecido ya que es mayor que 0,98.

Tabla 1. Resultados de la lectura de la curva estándar en el equipo PyrosKinetix Flex

Test ID:	19 - 09 - 16 VAL CEFEP	Report Date:	9/19/2016	3 : 10 : 27 pm	
Report Cover -19 - 09 - 164 VAL CEFEP					
Data Grup:	Default	Computer ID:	PC-3	Technician:	ADMIN
Water Lot:	AZA182294	Recon Buffer Lot:	N/A	Threshold OD:	20 mAbs
LAL Lot:	CK0005	Baseline Adjusted(sec):	300 - 500		
		Spike Recovery Limits( %):	50 - 200		
Endotoxin Lot:	139	Report GUID:	C49afb76-5559-45c5-9717-f362625c1ff5		
		Instrument	Pyros Kinetix Flex Chorm(405nm)		
		Temp:(1)	Min:36,9 °C Max:37,0 °C	Mean:37,0 °C	
		Temp:()	Min:36,9 °C Max:37,0 °C	Mean:37,0 °C	
		Temp:()	Min:37,0 °C Max:37,0 °C	Mean:37,0 °C	
Error:	No				
Test Comments:	None		Sing Off:	Pending	
Standard Curve:	Standard Curve-1		LAL Lot:	CK0005	
Description:			Endotoxin Lot:	139	
Concentration range:	0,00500 - 5,00 EU/mL		Excluded wells:	11, 12	
Slope: -0,230		Y Intercept: 2,94	Correlation Coef:	-0989	

En la tabla 2 se observa la destreza del analista para la obtención de las diferentes concentraciones de endotoxinas donde el coeficiente de variación de cada concentración de la curva es menor del 20 %.

Los resultados de la prueba preliminar reflejan la concentración de endotoxinas en la muestra



*Determinación de endotoxinas bacterianas por el método cromogénico cinético en el inyectable Cefepima*

que es usada para determinar la dilución del producto para la realización de la prueba de inhibición o realce. Esta prueba es requerida para validar el ensayo del producto, la dilución elegida para la prueba de inhibición o realce debe ser al menos el doble de la primera dilución en la cual no existe evidencia de endotoxinas o inhibición.

Tabla 2. Resultados de la preparación de la curva estándar

Tech: ADMIN ADMIN	Data Group: Default	Data Date: 9/19/2016	12 : 0643pm
Instrument SN:	Pyros Kinetix Flex Chorm(405nm)		Report ID: a7708aec
Sample Description	Standard / Spike Conc.	Mean Conc:	CV %
	Value	Unit	EU/ml
Standard 1	0,00500	EU/ml	0,00508
	0,0500	EU/ml	0,0508
	0,500	EU/ml	0,432
	5,00	EU/ml	5,39
	50,0	EU/ml	50,6
Standard 2	0,00500	EU/ml	0,005
	0,0500	EU/ml	0,00931
	0,500	EU/ml	0,176
	5,00	EU/ml	1,91
Standard 3	50,0	EU/ml	27,6
	0,00500	EU/ml	0,006990
	0,0500	EU/ml	0,0541
	0,500	EU/ml	0,650
	5,00	EU/ml	9,53
	50,0	EU/ml	50

En la tabla 3 se observan los resultados de la prueba de inhibición o realce con la dilución seleccionada y la concentración estándar (punto medio de la curva) como control positivo, donde el porcentaje de recobrado de las muestras es de 50 – 200 %. Se muestran los resultados de los tres lotes del producto ensayado y el límite de endotoxina en UE/mg, reportado por la USP para este producto.

Tabla 3. Resultados del ensayo inhibición o realce. Dilución de Trabajo

Samples Description	Samples Dilution	Mean Conc Value	Mean Spike Conc EU/ml	Unspiked EU/ml	Spike Recovery EU/ml	Mean Final Conc %R Value	Endotoxin Limit			
							Valu	Unit		
Standard 1		0,00500	0,00499				16,535		EU/mg	
		0,0500	0,0375				1,609		EU/mg	
		0,500	0,922				16,944		EU/mg	
		5,00	3,70				15,77		EU/mg	
Cefepima 1g 6010	1 : 1000	0,0500	< 0,005	0,0489	0,0679	136	< 0,025	0,06	EU/mg	
Cefepima 1g 6010 R-2	1 : 1000	0,0500	< 0,005	0,0689	0,0689	138	< 0,025	0,06	EU/mg	
Cefepima 1g 6010 R-3	1 : 1000	0,0500	< 0,005	0,0391	0,0691	138	< 0,025	0,06	EU/mg	
Cefepima 1g 6011	1 : 1000	0,0500	< 0,005	0,0374	0,0374	75	< 0,025	0,06	EU/mg	
Cefepima 1g 6011 R-2	1 : 1000	0,0500	< 0,005	0,0290	0,0390	78	< 0,025	0,06	EU/mg	
Cefepima 1g 6011 R-3	1 : 1000	0,0500	< 0,005	0,0364	0,0364	73	< 0,025	0,06	EU/mg	
Cefepima 1g 6012	1 : 1000	0,0500	< 0,005	0,0707	0,0607	121	< 0,025	0,06	EU/mg	
Cefepima 1g 6012 R-24	1 : 1000	0,0500	< 0,005	0,0616	0,0616	123	< 0,025	0,06	EU/mg	
Cefepima 1g 6012 R-3	1 : 1000	0,0500	0,00529	0,0643	0,0590	118	0,026	2,983	0,06	EU/mg
WaterNegCt				< 0,005						

## CONCLUSIONES

La curva estándar obtenida describe el comportamiento lineal y la calificación del analista, cumpliendo con el coeficiente de correlación ( $r \geq 0,98$ ). Las réplicas realizadas para la obtención de la curva estándar demuestran la repetibilidad de los resultados obtenidos por el analista al realizar las diluciones. Para la dilución 1/1000 se cumple con el criterio de recuperación establecido. Queda demostrado que con esta dilución no existe interferencia en el método. Esta dilución es apropiada para la realización de los ensayos de rutina.

El método cromogénico cinético para la determinación de endotoxinas bacterianas según los resultados obtenidos, permiten determinar que el ensayo queda validado para el producto Cefepima 1g.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Albarelos, G.; Montoya, L.; Lupi, M.; Denamiel, G. 2012. «Farmacocinética sérica y concentraciones tisulares cefoxitina después de su administración iv a gatos». *Selecciones Veterinarias*. 20(1).
- Associates of Cape Cod Inc. 2011. Manual de Instrucción del Test LALPyrotell®. Vial de Ensayo Único. East Falmouth, MA, USA: ACC.
- British Pharmacopoeia. 2009. Heparin Injection. Formulated Preparations: Specific Monographs. Volume 3. London, UK: British Pharmacopoeia.
- Burguet N, Brito L. 2012. «Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable Heparina Sódica», *Vacci Monitor*, 21(3) : 32 – 36.
- Baird R. 1988. Instructions for reconstitution, Control Standard endotoxin (CSE) Escherichia coli O11: H10. East Falmouth, MA, USA: ACC; Inc.
- CECMED. 2017. Buenas Prácticas Farmacéuticas. Sistema Regulador en Cuba. Segunda Edición. La Habana.
- Dawson M. 1996. Preliminary testing. *LAL Update*, 14(1) : 1 – 5.
- FDA. 1987. 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. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, FDA, December.
- Lewn, J; Bang, F. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 115(1) : 265 – 70.
- Núñez Freile, B. 2014. Las cefalosporinas. Uso racional de antibióticos. <es.scribd.com/doc/48370876 /cefalosporinas>[Consulta: 20 – 03 – 2016].
- Osorio, O.; Pérez, X.; Arias, J.; Rodríguez, D.; Fernández, C. 2007. Interferencias en la validación del ensayo de Lisado de Amebocitos de Limulus para Oxitetraciclina 500 mg/mL. *Revista Cubana de Farmacia*, 41(1) : 12 – 9.

*Raisa Medina Borges, Eliener Cuesta Garciarena, Xiomara Cisneros Laguna y José Arzola Ruiz*

Perdomo, R. 2004. «Ensayo del Lisado de Amebocitos del Limulus(LAL)». Revista Cubana de Farmacia, 38(1) : 8 – 15.

Rivas, K.; Rivas, M; Dávila, E. y Rodríguez, M. 2002. «Cefalosporinas de la primera a la cuarta generación». RFM. Caracas dez, v.25 n.2.

USP 40-NF 35. 2017. United States Pharmacopeial Convention. Rockville: Mack Printing. p.124.

Wikipedia. 2014. Cefalosporina. <es.wikipedia.org/wiki/antibiótico\_betalactámicos>[Consulta: 20 – 03 – 2016].

Fecha de recepción: 04/07/2019

Fecha de aceptación: 30/09/2019

### **Correspondencia**

José Arzola Ruiz

jarzola@cemat.cujae.edu.cu