DETECCIÓN DE ENDOTOXINAS CON LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS. APLICACIÓN EN FARMACIA DE HOSPITAL.

CARMEN LACASA DIAZ. SERVICIO DE FARMACIA.
HOSPITAL CIVIL DE BILBAO

PONENCIA PRESENTADA EN EL I SIMPOSIUM TEORICO-PRACTICO SOBRE "ENDOTOXINAS BACTERIANAS, SIGNIFICACIÓN BIOLÓGICA Y CUANTIFICACIÓN CON LISADO DE AMEBOCITOS DE LÍMULUS".

BARCELONA, 14 DE MARZO DE 1986.-

Detección de endotoxinas con lisado de amebocitos de Limulus (LAL). Aplicación en farmacia de hospital.

Introducción

El origen de este método de análisis de pirógenos se remonta a los comienzos del siglo XX. Loeb en 1902 y posteriormente Alsberg y Clarck en 1908 observaron que se producían fenómenos de coagulación en la hemolinfa de un invertebrado marino denominado Limulus polyphemus que aparece de forma abundante en las aguas litorales atlánticas americanas. Se le conoce vulgarmente como "cangrejo en herradura de caballo", debido a la forma que presenta su escudo promosómico o "cangrejo con cola de flecha" por la forma de su metasoma. Es un quelicerado perteneciente a la clase de los Merostomas, subclase Xifosuros, orden xifosúridos (Arístegui, 1978).

En 1956 Bang publica los estudios de los efectos de la infección bacteriana en Limulus; uniendo "in vitro" un lisado de amebocitos de Limulus (LAL) y un extracto de endotoxina bacteriana se forma un gel, de modo similar a como se produce la coagulación en el animal infectado (Graham, 1978).

Cooper et al (1971) describen un método de análisis de gelificación "in vitro". Daban como reacción positiva de la

presencia de pirógenos, la aparición de gelificación cuando se añadía al LAL el líquido problema (Lagodsky, 1979).

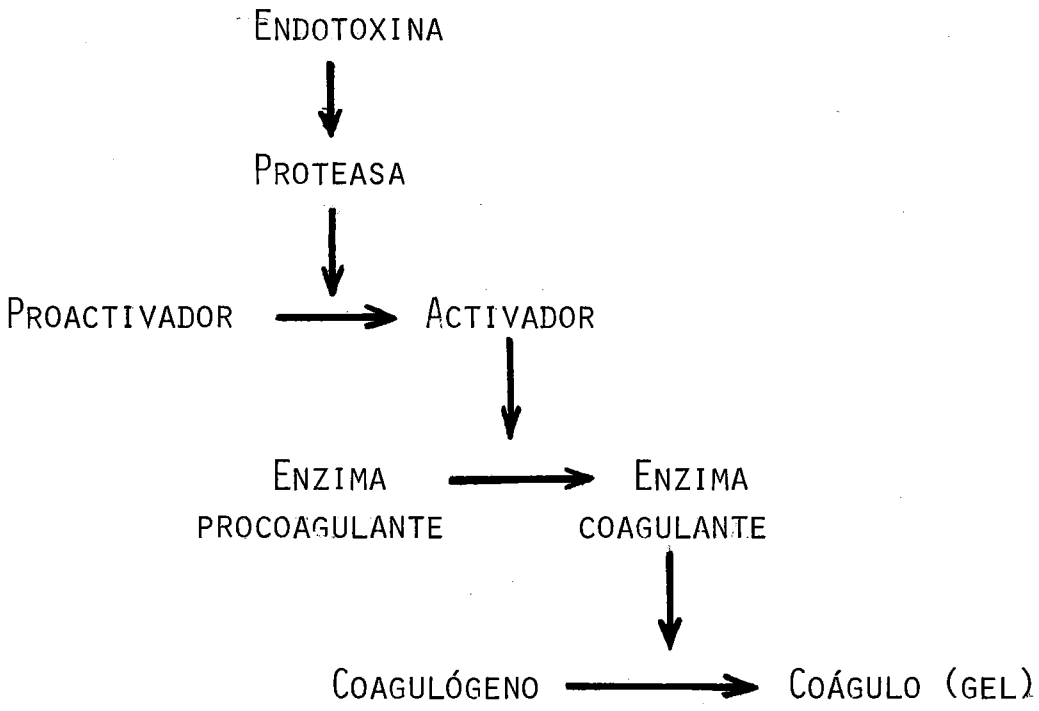
Levin (1985) explicaba el esquema del mecanismo de producción de la coagulación por la endotoxina en el Limulus (figura 1). Indicaba que los mismos inhibidores enzimáticos bloquean la coagulación en los mamíferos y en el cangrejo. También los mismos sustratos cromogénicos diseñados para análisis de los factores de coagulación humanos son excelentes sustratos para los componentes del sistema de coagulación en el Limulus.

Morita et al (1985) estudiaron el mecanismo de la coagulación por endotoxina en el cangrejo Tachypleus tridentatus. La endotoxina activa el factor C y este al factor B que transforma el enzima procoagulante en enzima coagulante. Este actua sobre el coagulógeno que pasa a gel. Todos estos factores han sido identificados como cadenas polipeptídicas de las que se conocen las secuencias.

Producción del reactivo LAL

En la producción del LAL hay métodos que han conseguido aumentar su sensibilidad, por ajuste de la concentración de

ESQUEMA DE LA COAGULACIÓN EN LAL POR ENDOTOXINA



cationes divalentes, ajuste del coagulógeno, adición de sustancias reguladoras, extracción con cloroformo etc. Después de estos tratamientos se liofiliza, para aumentar la estabilidad.

Endotoxina y lisado de referencia

La FDA seleccionó como endotoxina de referencia la de E. coli 113:H10:K. Se han preparado cinco lotes de la misma. El último, llamado EC 5, es el actual y se preparó en 1981. Es la endotoxina estandar de referencia y con ella se comparan las endotoxinas estandar de control de los diferentes fabricantes. Cada año se prepara un lote de lisado de amebocitos de Limulus de referencia que se analiza frente a EC 5 (Hochstein, 1985).

Interferencias

Cualquier sustancia que pueda desnaturalizar las proteinas o inhibir una reacción enzimática, deberá ser estudiada de forma particular para ser valorado su nivel de endotoxina por LAL; debido a que la reacción de gelificación es mediada por un enzima tipo tripsina, lábil al calor y sensible al pH (Cooper y Pearson, 1977).

ENDOTOXINA DE REFERENCIA

E. COLI 113:H10:K (FDA)

LOTES: EC 1 (1975)

EC 2

EC 3 Y EC 4 NO VÁLIDOS

EC 5 EL ACTUAL LOTE DE REFERENCIA

Esto se determina comparando la reactividad del lisado con una endotoxina en presencia y ausencia de la sustancia a analizar; asi como frente a la formulación completa, ya que también otros componentes que no sean los principios activos pueden modificar la gelificación (Van Noordwijk y De Jong, 1977).

En muchos casos la interferencia de la gelificación puede ser evitada ajustando el pH de la preparación dentro de los niveles de pH óptimo para el lisado, que oscilan entre 6 y 8 (Murata et al, 1976) o bien, diluyendo la muestra (Mc Cullough y Scolnick, 1976). Las muestras viscosas deberán mezclarse bien para ser analizadas (Daoust et al, 1976).

En la tabla 1 se indican algunas sustancias que se han mostrado compatibles con la reacción LAL y en la tabla 2 las que se han mostrado incompatibles.

Van Noordwijk (1979) señalaba que los inhibidores enzimáticos, los agentes desnaturalizantes de proteinas, suero o plasma y pH menor de 5 o mayor de 9, pueden causar reacciones negativas que hacen el análisis no válido debido a la inhibición. Fussellier en 1977 investigó la influencia de

Tabla 1. Sustancias compatibles con la reacción LAL

Sustancia	Dilucion	Referencia
Agua destilada	-	Fumarola et al, 1975
Bicarbonato sódico 4.2%	1/5	"
Bicarbonato sódico 8.4%	1/10	"
Bicarbonato sódico 1.4%	1/2	"
Cloruro cálcico 21.9%	1/20	"
Cloruro sódico 0.9%	-	"
Cloruro potásico 10%	1/10	Fusselier et al, 1977
Cloruro sódico 20%	1/10	"
Cloruro cálcico 1%	-	"
Cloruro magnésico 10%	1/5	"
Cloruro potásico 0.75%	-	"
Dopamina 1%	-	"
Dextrano 40 al 10%	-	Fumarola et al, 1975
Dopamina 5%	-	Fusselier et al, 1977
Gluconato cálcico 10%	1/10	"
Glucosa 66%	1/10	"
Glucosa 5 y 10%	-	Fumarola et al, 1975
Glucosa 50%	1/10	Fusselier et al, 1977
Glucosa 20%	1/2	"
Glucosa 30%	1/6	"
Ioduro sódico 1%	-	"
Ioduro sódico 5%	1/5	"
Manitol 10%	1/2	"
Procaina 1%	-	"
Polivinilpirrolidona 3.5	1/10	"
Sorbitol 5%	-	"
Sulfato magnésico 33%	1/10	"
Sulfato magnésico 15%	1/6	"
Salicilato sódico 10%	1/10	"
Xilitol 5%	-	Fumarola et al, 1975

Tabla 2. Sustancias que modifican la reacción de gelificación

Sustancias inhibidoras	Referencia
Alcohol bencílico > 0.1%	Cooper y Pearson (1977)
	Merlin (1979)
Acetilcisteina	Van Noordwijk (1979)
Acido ascórbico	Guilfoyle y Munson (1982)
Ampicilina	Van Noordwijk y Kruger (1983)
Bacitracina	"
Bisulfito sódico	Guilfoyle y Munson (1982)
Cloranfenicol	Kruger et al (1976)
	Van Noordwijk (1979)
Clorhidrato de Tetraciclina	Van Noordwijk y De Jong (1977)
Citratos	Fussellier et al (1977)
Cisteina	Kobayshi et al, 1975
Carbozocromo salicilato	Guilfoyle y Munson (1982)
Ciclicina lactato	"
Emulsiones grasas	Van Noordwijk (1979)
EDTA	Guilfoyle y Munson (1982)
Edetato disódico	"
Estreptomicina	Van Noordwijk y Kruger (1983)
Fenol	Guilfoyle y Munson (1982)
Fluoresceina sódica	"
Glutation	Van Noordwijk (1979)
Heparina	Guilfoyle y Munson (1982)
I-131 bromosulfaleina	Murata (1976)
I-131 rosa de bengala	Guilfoyle y Munson (1982)
Ketamina	"
Oxacilina sódica	"
Penicilina procaina	Van Noordwijk y Kruger (1983)
Prometazina	Guilfoyle y Munson (1982)
Polimixina B	Van Noordwijk y Kruger (1983)
Sulfisoxazol diolamina	Guilfoyle y Munson (1982)
Sulfobromoftaleina	"
Soluciones A.C.D.	Fussellier et al (1977)
Soluciones C.P.D.	"
Tiroxina	"
Zn-69m acetato de cinc	Mc Auley et al (1974)

la multiplicidad de iones sobre el análisis LAL, observando que no la modificaba. Los productos que contienen concentraciones importantes en glucoheptonato de calcio o gluconato de calcio, precisan ser diluidos para evitar gelificación que perturbe la reacción.

Van Noordwijk en 1979 observó que diluyendo las muestras en distinta proporción para cada sustancia evitaba la ihibición, aunque no en todos los casos.

Guilfoyle y Munson de la FDA en 1982 definían la máxima dilucion válida (MDV) para ser analizada. La MDV se calcula en dos etapas:

1) Mínima concentración valida (MCV):

$$MCV = \frac{S\ M}{K}$$ donde:

S = Sensibilidad del reactivo LAL en unidades de endotoxina por ml (EU/ml)

M = Dosis sobre conejo o maxima dosis humana/kg, la que sea mayor.

K = Limite de tolerancia, 5 EU/kg (1 ng/kg)

2) Máxima dilución valida (MDV):

$$MDV = \frac{\text{Concentracion del producto}}{\text{MDV}}$$

$$MDV = \frac{\text{C (conc. producto) x 5 EU/kg (limite)}}{\text{S (sens. reactivo) x M (dosis max/kg)}}$$

El producto se diluirá una parte a MDV partes con agua o cloruro sódico 0.9% del reactivo LAL.

Otra forma de suprimir la inhibición es la ultrafiltración que puede aplicarse cuando la sustancia inhibidora tiene una masa molecular muy inferior a la de las endotoxinas. Estas son retenidas sobre filtros moleculares cuyo limite nominal de separación esta comprendido entre 10.000 y 20.000. Después se redisuelven en un disolvente adecuado y la solución así obtenida, se somete al análisis LAL (Maignan, 1978; Van Noordwijk y Kruger, 1983).

Cooper (1985) señalaba que cuando existen problemas de inhibición es preciso seleccionar el método LAL más adecuado para cada producto que interfiere. En ausencia de incompatibilidad, los diferentes métodos LAL detectan niveles de endotoxina similares.

Interferencias con el método LAL

Máxima dilución válida (MDV) permitida (FDA, 1983)

$$MDV = \frac{C.\ K}{\lambda.\ M}$$

C = Concentración del producto en mg/mL o U/mL o mL/mL

K = 5 UE/Kg de peso en preparaciones parenterales
0.2 UE/Kg de peso en preparaciones intratecales

M = Dosis en conejo en mL/Kg o dosis máxima humana en una hora, dosis/kg/hora

λ - Método gel-no gel: Sensibilidad etiquetada del lisado en UE/mL
- Método sustrato cromogénico: El punto más bajo utilizado en la recta de calibrado.

Aplicaciones del analisis LAL

Se ha utilizado para la deteccion de endotoxina en agua para inyección, materias primas, parenterales de gran volumen, inyectables de pequeño volumen, radiofármacos, soluciones para diálisis, hemoderivados, medicamentos de administración intratecal, etc.

Munson (1985), de la FDA, daba la guía para la validación del análisis LAL en medicamentos parenterales. Señalaba las condiciones a cumplir en las distintas técnicas, gel firme, turbidimétrica y con sustrato cromogénico. Esta guía indica la forma de realizar los cálculos en caso de que por interferencias sea preciso diluir las muestras y sea necesario hallar la máxima dilución válida (MVD) (figura 5).

En farmacia de hospital hemos observado distintas aplicaciones del método LAL (tabla 8). En ocasiones se plantean sospechas de que una preparación haya dado una reacción pirogénica. Si se envía a un laboratorio exterior al hospital, la respuesta puede ser lenta. En el servicio de farmacia de nuestro hospital se nos ha planteado esta misma consulta en distintos casos y después de analizar los inyectables sospechosos han resultado siempre negativos.

Sin embargo, en un análisis LAL-gel firme, que realizamos en nuestro laboratorio, de un inyectable de bupivacaina con glucosa al 8% sospechoso de haber causado meningitis aséptica

APLICACIONES DEL ANÁLISIS LAL EN PREPARACIONES FARMACÉUTICAS

- PARENTERALES DE GRAN VOLUMEN
- PARENTERALES DE PEQUEÑO VOLUMEN
- AGUA PARA INYECCIÓN
- CONTROL EN PROCESO
- RADIOISÓTOPOS
- EQUIPOS MÉDICOS
- PREPARACIONES INTRATECALES

en pacientes sometidos a anestesia epidural en dos hospitales, los resultados fueron positivos (gel firme). Esto coincide con los casos de meningitis aséptica comunicados por Cooper y Pearson (1977) después de la administración intratecal de radiofármacos que dieron análisis LAL positivos.

El inyectable de bupivacaina que analizamos por LAL, dió resultados negativos en el análisis de pirógenos en conejos (Rodriguez Sasiain, 1986).

Otro campo de aplicación en farmacia de hospital del análisis LAL es el control de pirógenos en inyectables de pequeño volumen que la industria farmacéutica no fabrica y deben preparar los farmacéuticos de hospital.

También puede ser de interés analizar el contenido en endotoxina de material médico (equipos de infusión, catéteres, válvulas cardiacas, protesis etc) para seleccionarlo adecuadamente y dar información en las comisiones de compras en las que participa el farmacéutico. En este sentido es de interés la aportación de Ross (1985), de la FDA, que comunica mayor recuperación de endotoxina si se utiliza laurilsulfato sódico al 0.01% en agua como líquido de extracción.

APLICACIÓN DEL ANÁLISIS LAL EN FARMACIA DE HOSPITAL

- INYECTABLES DE PEQUEÑO VOLUMEN
- PREPARACIONES INTRATECALES
- ANÁLISIS DE PREPARACIONES SOSPECHOSAS DE CONTAMINACIÓN PIROGÉNICA
- EQUIPOS MÉDICOS

Evaluacion del anális LAL

Es más sencillo, más sensible y menos costoso que el ensayo en conejos. Si se producen inhibiciones es preciso seleccionar de entre los métodos LAL disponibles el más adecuado al producto en cuestión. En farmacia de hospital hemos observado ventajas de rapidez y sensibilidad dada la dificultad de contar en un servicio de farmacia de hospital con el análisis en conejos.

Bibliografia:

1. ALSBERG C.L., CLARK E.D. (1908) The blood clot of Limulus polyphemus. J. Biol. Chem., 5, 523.

2. ARISTEGUI F.J. (1978). Contribucion al conocimiento de los nuevos metodos de diagnostico de las meningitis purulentas con especial referencia a las tecnicas de contrainmunoelectroforesis y el test Limulus. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad del Pais Vasco. p. 53-54.

3. BANG F.B. (1956) A bacterial disease of Limulus polyphemus. Bull John Hopkins Hosp 98:325-351.

4. COOPER J.F., LEVIN J., WAGNER H.N. (1971) Quantitative comparison of in vitro and in vivo methods for the detection of endotoxin. J. Lab. Clin. Med. 78, 138-148.

5. COOPER J.F., PEARSON S.M. (1977) Detection of endotoxin in biological products by the Limulus test. Dev. Biol. Stand. 34, 7-13.

6. DAOUST D.R., ORLOWSKI S.j., MC MAHON G., WEBER C.K., SHAW W.C., FISCHER T.C., BENNET C.R., (1976). Limulus amoebocyte lysate test as a

method for detection of endotoxins and endotoxin-like materials. Bull Parenter. Drug Assoc. 30, 13-20.

7. FUMAROLA D., PASQUETTO N., BRANDONISIO O., MARCUCCIO L., PANARO A., MONNO R. (1975). Limulus test e preparazioni iniettabili apirogene. Studio Quad. Sclavo Diagn.,11,4.

8. FUSSELLIER M., LAGODSKY H., BENARD M., BRIN M.A., DESCHAMPS F., MAIGNAN M., MERLIN L., PERRAULT G., RINJARD P., STORCK J., WACHTER A. (1977). Commision de Travail de la Societe Francaise des Sciences et Techniques Pharmaceutiques. Le test Limulus. R. Sci. Tech. Pharm. 6, 6, 293-305.

9. FUSSELLIER M., LAGODSKY H., STORCK J., BENARD M., BRIN A., DESCHAMPS F., MAIGNAN N., MERLIN L., PERRAULT G., RINJARD P., WACHTER A. (1983) Le test Limulus. Actualisation (1983) Sci. Tecnn. Pharm. 12, 9, 433-434.

10. GUILFOYLE Y MUNSON (1982) Procedures for improving detection of endotoxin in products found incompatible for direct analysis with Limulus amebocyte lysate en "Endotoxins and their detection with the Limulus amebocyte lysate test" p. 79-90. Alan R. Liss, Inc, 150 Fith Avenue, New York, N.Y. 10011.

11. HOCHSTEIN H.D. (1985) Quality control for LAL and endotoxin, en "Bacterial Endotoxins: Structure, Biomedical Significance, and Detection with the Limulus amebocyte lysate test", p 221-239. Alan R. Liss, Inc.

12. KOBAYSHI M., MORIMOTO T., YAUMOTO M. (1975) Studies of the gelation reaction of Limulus lysate (pre-gel). III Influences of various substances on the gelation reaction of Limulus lysate. Yakugaku Zasshi 95, 720-727.

13. KRUGER D., ZIMMERMAN G., HEBOD G. (1976) In vitro-pyrogen prufung mittels des limulus tests. Arzneim. Forsch. 26, 21-22.

14. LEVIN J. (1985) The history of the development of the Limulus amebocyte lysate test, en "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance, and detection with the Limulus amebocyte lysate test", p. 3-28. Alan R. Liss, Inc.

15. LOEB L. (1902) On the blood lymph cells and inflamatory processes of Limulus. J. Med. Res. 7, 145.

16. MAIGNAN M. (1978) Recherche de substances pyrogenes par LAL dans les produits de contraste. Deuxieme Technique d'ultrafiltration. Lab. Pharma. Problemes et techniques, 279, 677-680.

17. MC AULEY R.J., ICE R.D., CURTIS E.G. (1974) The Limulus for in vitro pyrogen detection. Am. J. Hosp. Pharm. 31, 688-691.

18. MC CULLOUGH K.Z., SCOLNICK S.A. (1976) Effect of semisynthetic penicillins on the Limulus lysate test. Microbiol. Agents Chemother. 9, 856-858.

19. MERLIN L. (1979) Controle des preparations radiopharmaceutiques a l'aide du lysat d'amoebocytes de Limulus polyphemus. J. Pharm. Belg. 34, 3, 164-165.

20. MORITA T., NAKAMURA T., MIYATA T., SADAAKI I. (1985) Biochemical characterization of Limulus clotting factors and inhibitors wich interact with bacterial endotoxins en "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance and detection with Limulus amebocyte lysate p 53-64. Alan R. Liss.

21. MUNSON T.E. (1985) Guideline for validation of the LAL test for human and biological drug products, en "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance and detection with the Limulus amebocyte lysate p 211-220. Alan R. Liss.

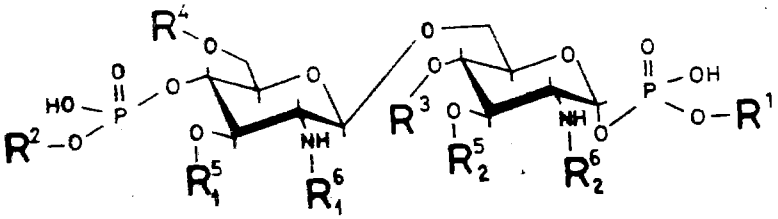
22. MURATA H., KOBAYASHI M., LIO M., YAMADA H., CHIBA K., MATSUI K., KAWAGUCHI S. (1976) Sensitivity of the Limulus test and inhibitory factors in the radiopharmaceuticals. J. Nucl. Med. 17, 12, 1088.

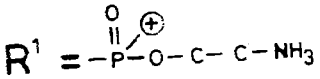
23 ROSS V., TWOHY W. (1985) Endotoxins and medical devices, en "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance and detection with Limulus amebocyte lysate" p 267-268. Alan R. Liss

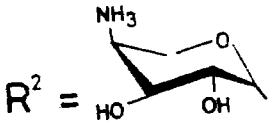
24. VAN NOORDWIJK J. and DE JONG Y. (1977) Comparison of the Limulus amoebocyte lysate (LAL) test with the rabbit test: false positives and false negatives. Dev. Biol. Stand. 34, 39-43.

25. VAN NOORDWIJK J. (1979) A comparison between the Limulus amoebocyte lysate test and the rabbit pyrogen test. J. Pharm. Belg. 34,3, 142-144.

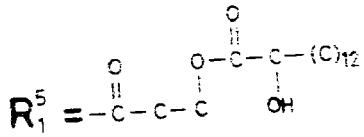
26. VAN NOORDWIJK J., KRUGER D. (1983) Pharmacopoeia European Commision. Group of experts No. 1 L. Elimination of factors interfering with the LAL test. Council of Europe.

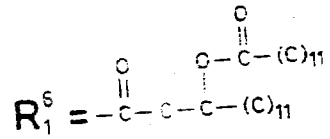


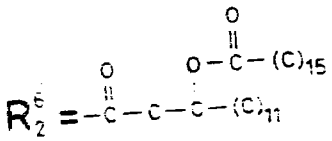












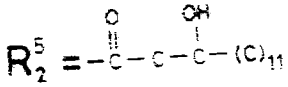


Fig. 3: Estructura más frecuente del lípido A (modificada de Rietschel et al, 1994)

ESQUEMA DE LA COAGULACIÓN EN LAL POR ENDOTOXINA

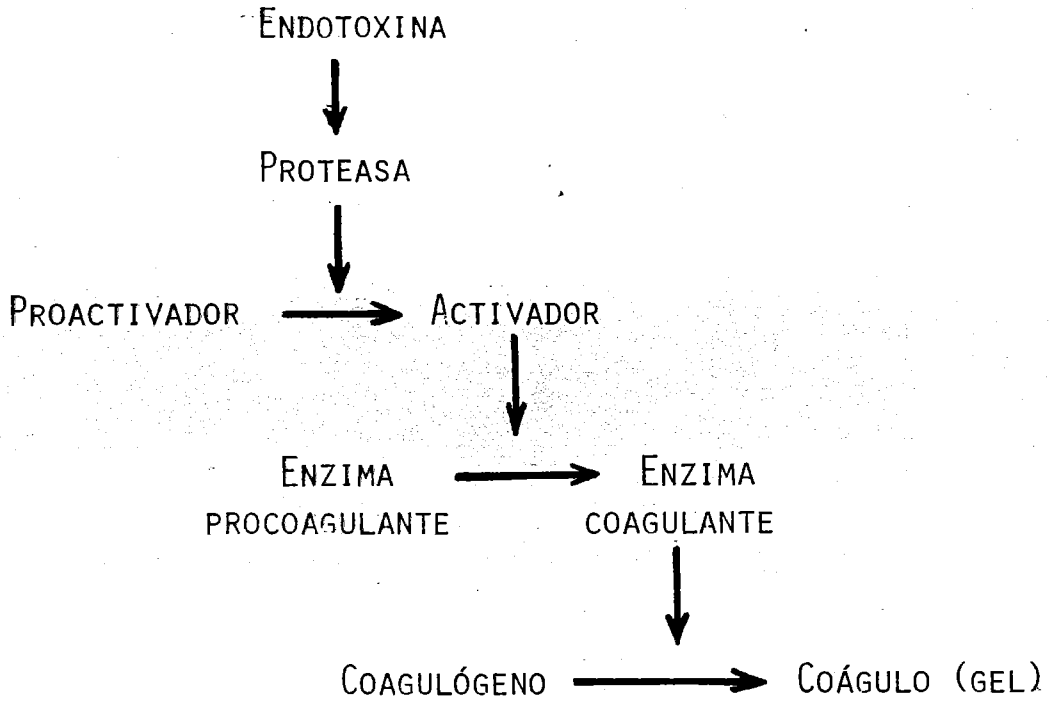


TABLA 3

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL LPS DE ENTEROBACTERIAS

TÓXICAS

ABORTO
ADIPSIA, AFAGIA, DIARREA
AGREGACIÓN PLAQUETARIA
NECROSIS MÉDULA ÓSEA
HIPOFERREMIA
HIPOTENSIÓN
PIROGENICIDAD
GELIFICACIÓN DEL LAL
EFECTO SCHWARTZMAN
INHIBICIÓN FIBRINOLISIS
LEUCOPENIAS Y LEUCOCITOSIS
MENINGITIS ASÉPTICA
PERITONITIS ASÉPTICA

TABLA 3 (CONT)

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL LPS DE ENTEROBACTERIAS

- INMUNOLÓGICAS

  CAPACIDAD ADYUVANTE
  MITÓGENA LINFOCITOS B
  UNIÓN A MEMBRANAS CELULARES
  AUMENTO FAGOCITOSIS
  ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS
  ANTÍGENO ESPECÍFICO DE ESPECIE

- PROTECCIÓN NO ESPECÍFICA

  TOLERANCIA A ENDOTOXINA
  AUMENTO PROTEOLISIS

Interferencias con el método LAL

Máxima dilución válida (MDV) permitida (FDA, 1983)

$$MDV = \frac{C \cdot K}{\lambda \cdot M}$$

C = Concentración del producto en mg/mL o U/mL o mL/mL

K = 5 UE/Kg de peso en preparaciones parenterales
0.2 UE/Kg de peso en preparaciones intratecales

M = Dosis en conejo en mL/Kg o dosis máxima humana en una hora, dosis/kg/hora

λ - Método gel-no gel: Sensibilidad etiquetada del lisado en UE/mL
- Método sustrato cromogénico: El punto más bajo utilizado en la recta de calibrado.

APLICACIONES DEL ANÁLISIS LAL EN PREPARACIONES FARMACÉUTICAS

- PARENTERALES DE GRAN VOLUMEN
- PARENTERALES DE PEQUEÑO VOLUMEN
- AGUA PARA INYECCIÓN
- CONTROL EN PROCESO
- RADIOISÓTOPOS
- EQUIPOS MÉDICOS
- PREPARACIONES INTRATECALES