XXX congreso nacional de la asociación española de farmacéuticos de hospitales

Las Palmas de Gran Canaria

TOMO II

ASOCIACION ESPAÑOLA
DE FARMACEUTICOS
DE HOSPITALES

ANALISIS DE ENDOTOXINA EN SOLUCIONES I.V. DE GRAN VOLUMEN

T. Boada, A. Aguirrezabal, M. Alvarez, M. L. Vilella, M. J. Yurrebaso y C. Lacasa

Servicio de Farmacia.
Hospital Civil de Bilbao

INTRODUCCION

En los comienzos del siglo XX se observa con el aumento de la práctica de la administración i.v. un incremento de las reacciones febriles severas.

Estudios experimentales realizados con posterioridad demuestran:

A) Sólo las soluciones estériles y libres de endotoxina no daban reacciones febriles.

B) La fiebre, por inyección, se producía por la presencia de productos bacterianos termoestables (Personeus, 1973).

El mecanismo de la acción pirogénica, productora de la fiebre, no se conoce con seguridad (Dony, 1979).

Actualmente se distingue entre:

a) Endotoxinas lipopolisacáridos, procedentes de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, que son los pirógenos más importantes; y exotoxinas, de naturaleza peptídica, excretadas al medio por las bacterias gram-positivas.

b) Pirógenos exógenos, LPS y otras muchas sustancias que proceden de fuera; y pirógenos endógenos (EP) proteicos producidos por los leucocitos (Dinarello y Woll, 1982).

En la década de los setenta causó un gran impacto el método de lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL) para detección de endotoxinas. Se han utilizado varias modalidades de este método: Gel firme no gel, turbidimétrico o por sustrato cromogénico (Fusselier y cols., 1983).

OBJETIVOS

Se analiza y compara el contenido en endotoxina de soluciones de glucosado 5 por 100 y cloruro sódico 0,9 por 100 de tres laboratorios farmacéuticos a través del método LAL (lisado de amebocitos de cangrejo *Limulus polyphemus),* por determinación de sustrato cromogénico (Coatest® endotoxin).

Laboratorio	N.° lote	
	Glucosado 5%	Cloruro sódico 0,9%
Travenol	V100-K27C2 X22-C13C2	X16-BO8C3 X34-CO5C4
Dade Grifols	V-408 X-108	X-262 V-602
Andalucía Farmacéutica	X-38 X-74	X-32 X-38

Para ello se analizaron dos lotes distintos de cada solución, realizándose 12 determinaciones por lote. Como referencia patrón se utilizaron soluciones con bajo contenido en endotoxinas:

Glucosado 5% TRAVENOL	Lote: X28-D18C2
Cloruro Sódico 0,9% TRAVENOL	Lote: X47-D12C1

MATERIAL Y METODOS

Se eligió el método LAL Coatest® endotoxin, que mide la concentración de endotoxina mediante la liberación por reacción enzimática de p-nitroanilina, como se ve en el esquema siguiente:

PROENZIMA + ENDOTOXINA ⟶ ENZIMA
de LAL.

ENZIMA

SUSTRATO ⟶ PEPTIDO + p-NITROANILINA

Ac-Ile-Glu-Gly-Arg-pNa Ac-Ile-Glu-Gly-Arg pNa

La endotoxina de gram-negativos cataliza, pues, la activación de un sistema enzimático en los amebocitos circulantes del cangrejo en herradura *Limulus polyphemus* (LAL). El enzima cataliza la ruptura del sustrato cromogénico con formación de un producto coloreado (pNa) que puede ser medido fotométricamente. La cantidad de color desarrollada es linealmente proporcional a la cantidad de endotoxina presente.

MATERIAL DE ANALISIS

— Kit Coatest® endotoxin Lote: 8839251 (Cad. 9/85) que contiene:

1. S 2423.

9 ng. de sustrato cromogénico liofilizado (Ac. Ile-Glu-Gly-Arg-pNa HCl).

2. Limulus Amebocyte Lysate (LAL) liofilizado obtenido de Whitthaker M. A., Bioproducts Walkersville M. D. USA.

3. Endotoxin (E. coli 011:B4).

2 ng. (aproximadamente, 25 U, comparando con el FDA estándar EC-5) de endotoxina en albúmina.

4. Buffer.

Tris 50 mmol/l. pH 9 estéril y apirógeno.

— Agua estéril para irrigación Lote: V4-C30C3 y X5-F04C1.

— Fotómetro atom-334 data-test.

— Baño de calor Tectron Selecta a 37° ± 0,1° C.

— Vortex Cenco Instrumenten b.v.

— Cronómtro Helier.

— Jeringas estériles y apirógenas de polipropileno ICO de 1 y 5 ml.

— Tubos Pyrex de 5 y 15 ml. apirógenos.

— Pipetas automáticas de 200 y 5.000 µl. con puntas desechables EPPENDORF estériles y apirógenas.

— Acido clorhídrico.

— Acido acético 50 por 100.

METODO DE ANALISIS

Se construyen dos rectas de calibrado con fluidos de gran volumen de bajo contenido en endotoxina de cloruro sódico 0,9 por 100 y glucosado 5 por 100, y con las siguientes diluciones de endotoxina en picogramos/ml.: 100, 75, 50, 25 y 12,5.

TECNICA DE ANALISIS

Muestra o estándar (20-25° C)	100 µl
Calentar a 37° C 3-5 minutos	
LAL	100 µl
Mezclar e incubar a 37° C	10 minutos exactos
Solución sustrato-buffer (37° C)	200 µl
Mezclar e incubar a 37° C	3 minutos exactos
Acido acético 50% en agua estéril y apirógena	200 µl
Mezclar inmediatamente	

Se comienza a contar el tiempo cuando se añade LAL a cada tubo y debe continuar sin interrupción hasta la última etapa.

Leer la absorbancia de las muestras y estándar frente a un blanco de referencia con bajo contenido en endotoxina tratado con la técnica de análisis anterior en un fotómetro a 405 nm.

El color es estable por lo menos cuatro horas.

RESULTADOS

CONCENTRACIONES DE ENDOTOXINA EN GLUCOSADO AL 5%

Travenol		Andalucía Farmacéutica		Dade Grifols	
Lote		Lote		Lote	
X22-C13C2	V100-K27C2	X-38	X-74	V-408	X-108
< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5
< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	15,5
< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5
< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	14,5
< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	18,5	27,5
< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5

Las concentraciones de endotoxina se expresan en pg/ml. Cada una de ellas es media de dos determinaciones.

CONCENTRACIONES DE ENDOTOXINA EN CLORURO SODICO AL 0,9%

Travenol		Andalucía Farmacéutica		Dade Grifols	
Lote		Lote		Lote	
X-16B08C3	X-34C05C4	X-38	X32	X-262	X-602
< 12,5	14,4	< 12,5	13,5	< 12,5	< 12,5
18,6	< 12,5	17,1	22	< 12,5	13,75
25,75	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5
< 12,5	< 12,5	12,9	< 12,5	< 12,5	< 12,5
30	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5	< 12,5
< 12,5	< 12,5	< 12,5	15	< 12,5	14,75

Las concentraciones de endotoxina se expresan en pg/ml. Cada una de ellas es media de dos determinaciones.

CONCLUSIONES

1. Se establece la utilidad del test LAL por determinación del sustrato cromogénico para medir las concentraciones de endotoxina en cloruro sódico al 0,9 por 100, y en glucosado 5 por 100. Deben cumplirse estrictamente las condiciones del análisis.

2. En las condiciones descritas, el método es semicuantitativo. No existen diferencias apreciables entre las distintas marcas comerciales. Todas ellas presentan concentraciones de endotoxina por debajo del límite aceptado por Pearson y Weary (1982) de 100 pg/ml., siendo la mayoría inferiores a 12,5 pg/ml.

3. Por el resultado obtenido se recomienda aumentar el tiempo de incubación de LAL y muestra a 20-30 min., debido a los márgenes tan bajos de endotoxina que se detectan.

Bibliografía

(1) Dinarello, C. A., y Wolff, S. M.: «Exogenous pyrogens», en «Pyretics antipyretics». *Handb. Exp. Pharm.*, 60(4): 112, 1982.

(2) Dinarello, C. A., y Wolff, S. M.: «Pathogenesis of fever in man». *N. Engl. J. Med.*, 298: 607-612, 1978.

(3) Dony, J.: «Les endotixins et leurs effects biologics». *J. Pharm. Belg.*, 34: 127-133, 1979.

(4) Fussellier, M.; Lagodsky, H.; Bernard, M.; Brin, M. A.; Deschamps, F.; Maignan, M.; Merlin, L.; Perrault, G.; Rinjard, P.; Storck, J., y Wachter, A.: «Le test Limulus». Commision de Travail de la Societé Française des Sciences et Technique Pharmaceutiques. *R. Sci. Tech. Pharm.*, 6(6): 293-305, 1977.

(5) Gander, G. W.: «Endogenous pyrogens», en «Pyretics and antipyretics». *Handb. Exp. Pharm.*, 60(5): 113-123, 1982.

(6) Iwanaga, S.: «Chromogenic substrates for horsehoe crab clotting enzyme. Its application for the assay of bacterial endotoxins». *Haemostasis*, 7: 183, 1978.

(6) Personeus, G. R.: «Pyrogen testing of parenteral pharmaceutical». *Qual. Contr. Pharm. Ind.*, 2: 239-268, 1973.

(7) Scully, M. F.: «Evaluation of a chromogenic method for endotoxin measurement». *Thromb. Res.*, 20: 263, 1973.

(8) United States Pharmacopoeia XX - National Formulary XV: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852.

(9) United States Pharmacopoeia XXI - National Formulary XVI: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852.

(10) Wolff, S. M.; Mulholland, J. H., y Ward, S. B.: «Quantitative aspects of the pyrogenic response of rabbits to endotoxin». *J. Lab. Clin. Med.*, 65: 268-276, 1965.

ASOCIACION ESPAÑOLA
DE
FARMACEUTICOS DE HOSPITALES

DON MIGUEL ANGEL WOOD WOOD, LCDO. EN FARMACIA Y SECRETARIO DEL XXX CONGRESO NACIONAL DE LA ASOCIACION ESPAÑOLA DE FARMACEUTICOS DE HOSPITALES,

C E R T I F I C A QUE EL/LA SR/SRA. DON/DOÑA **CARMEN LACASA DIAZ.**

.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-.- HA ASISTIDO AL CITADO XXX CONGRESO-CELEBRADO EN ESTA CIUDAD LOS DIAS 25, 26 Y 27 DEL PRESENTE MES, EN CALIDAD DE CONGRESISTA. **PRESENTANDO EL SIGUIENTE TRABAJO:**

" ANALISIS DE ENDOTOXINAS EN SOLUCIONES INTRAVENOSAS DE GRAN VOLUMEN "

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, A VEINTE Y SIETE DE SEPTIEMBRE DE-MIL NOVECIENTOS OCHENTA Y CINCO.