

FARMACOPEA MERCOSUR: ENSAYO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

VISTO: El Tratado de Asunción, el Protocolo de Ouro Preto y las Resoluciones N° 31/11 y 22/14 del Grupo Mercado Común.

CONSIDERANDO:

Que la Farmacopea MERCOSUR tiene como objetivo establecer los requisitos mínimos de calidad y seguridad de los insumos para la salud, especialmente de los medicamentos, apoyando las acciones de reglamentación sanitaria y promoviendo el desarrollo técnico, científico y tecnológico regional.

Que las especificaciones farmacopeicas establecen, por medio de monografías, requisitos mínimos para el control de seguridad y calidad de los insumos, especialidades farmacéuticas, plantas medicinales y derivados producidos o utilizados en los Estados Partes.

Que las especificaciones farmacopeicas son utilizadas como parámetro para las acciones de vigilancia sanitaria, incluyendo el registro de medicamentos, inspecciones y análisis de laboratorio.

Que la Farmacopea MERCOSUR y la producción de patrones propios de calidad favorecen al desarrollo científico y tecnológico de los Estados Partes, contribuyendo a la disminución de la dependencia de proveedores extranjeros y promoviendo a la industria regional.

Que la Farmacopea MERCOSUR debe ser primordialmente sanitaria, con énfasis en la salud pública, y presentar una metodología analítica accesible a los Estados Partes, buscando su reconocimiento y respetabilidad internacional.

Que el diálogo regulatorio y la integración entre los Estados Partes promueven el acceso de la población a medicamentos con mayor calidad y seguridad.

Que el Acuerdo N° 08/11 de la Reunión de Ministros de Salud del MERCOSUR constituye un marco de referencia para la Farmacopea MERCOSUR.

**EL GRUPO MERCADO COMÚN
RESUELVE:**

Art. 1 - Aprobar, en el marco de lo establecido en la Resolución GMC N° 22/14, la monografía "Farmacopea MERCOSUR: Ensayo de Endotoxinas Bacterianas", que consta como Anexo y forma parte de la presente Resolución.

Art. 2 - Los Estados Partes indicarán en el ámbito del SGT N° 11 los organismos nacionales competentes para la implementación de la presente Resolución.

Art. 3 - Esta Resolución deberá ser incorporada al ordenamiento jurídico de los Estados Partes antes de...

XLIII SGT N° 11 – Brasilia, 10/IV/15.

ANEXO

ENSAYO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

El Ensayo de Endotoxinas Bacterianas (EEB) es un ensayo para detectar o cuantificar endotoxinas de bacterias gram negativas usando un lisado de amebocitos del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*).

Hay tres métodos para éste ensayo: el método de coagulación (gel-clot), la cual está basada en la formación de gel en presencia de cationes divalentes; el método turbidimétrico, basado en la producción de turbidez después de la ruptura de uniones de un sustrato endógeno; y el método cromogénico que se basa en el desarrollo de color después de la ruptura de un complejo sintético péptido-cromógeno. Efectuar el ensayo con cualquiera de los tres métodos. En caso de duda o controversia, la decisión final se toma basándose en el ensayo límite de coagulación, a menos que se indique algo diferente en la monografía del producto en análisis. El ensayo se efectúa de forma tal que se evite la contaminación por endotoxinas.

Materiales

Eliminar los pirógenos de todo el material de vidrio y otros materiales termoestables en un horno de aire caliente, mediante un proceso validado. Si se emplean materiales de plástico, tales como microplacas y puntas de pipetas para pipeteadores automáticos, usar los que han demostrado estar exentos de endotoxinas detectables y no interferir con el ensayo. En este capítulo, el término "tubo" incluye cualquier otro receptáculo, como por ejemplo los pocillos de las placas de microtitulación.

Reactivos y Soluciones de ensayo

Lisado de Amebocitos—Un producto liofilizado obtenido a partir de un lisado de amebocitos (leucocitos) del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus*

tridentatus). Este reactivo se refiere sólo a un producto fabricado de conformidad con las reglamentaciones de la autoridad competente.

El Lisado de Amebocitos reacciona con algunos β -glucanos además de reaccionar con las endotoxinas. Existen preparaciones que no reaccionan con los glucanos, se preparan retirando o inhibiendo el factor G que reacciona con los glucanos.

Agua para Ensayo de Endotoxinas Bacterianas (EEB)— Usar agua para inyección o agua producida por otros procedimientos que no reaccione con el lisado empleado, en el límite de detección del reactivo.

Reactivo LAL —Disolver con agitación suave el *Lisado de Amebocitos en Agua para EEB* o en una solución amortiguadora recomendada por el fabricante del lisado. Almacenar el lisado reconstituido, refrigerado o congelado, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Preparación de las soluciones

Solución Madre del Estándar de Endotoxina—Preparar una *Solución Madre de Estándar de Endotoxina* a partir de un Estándar de Referencia Internacional vigente o de una Endotoxina control que haya sido calibrada contra el mismo. Seguir las especificaciones en el prospecto del empaque y en la etiqueta para la preparación y almacenamiento de la *Solución Madre del Estándar de Endotoxina*. El contenido de endotoxina se expresa en Unidades de Endotoxina (UE). [NOTA: Una Unidad de Endotoxina (UE) es igual a una Unidad Internacional (UI) de endotoxina.]

Soluciones Estándar de Endotoxina—Después de mezclar vigorosamente la *Solución Madre del Estándar de Endotoxina*, preparar las diluciones seriales apropiadas de la *Solución Estándar de Endotoxina*, usando *Agua para EEB*. Usar las diluciones tan pronto como sea posible para evitar la pérdida de actividad por adsorción.

Soluciones Muestra—Preparar las *Soluciones Muestra* disolviendo o diluyendo los

productos, usando *Agua para EEB*. Algunas sustancias o preparaciones se pueden disolver o diluir adecuadamente en otras soluciones acuosas. Si fuera necesario, ajustar el pH de la solución (o de la dilución) a examinar de modo que el pH de la mezcla del lisado y la *Solución Muestra* se encuentre dentro del intervalo de pH especificado por el fabricante del lisado, por lo general entre 6,0 y 8,0. El pH se puede ajustar con un ácido, una base o una solución amortiguadora adecuada según lo recomiende el fabricante del lisado. Los ácidos y las bases se pueden preparar a partir de concentrados o sólidos con *Agua para EEB* en recipientes exentos de endotoxinas detectables. Se debe comprobar que las soluciones amortiguadoras están exentas de endotoxinas y otros factores de interferencia detectables.

Determinación de la Máxima Dilución Válida (MDV)

La máxima dilución válida es la dilución máxima permisible de una muestra a la que se le puede determinar el límite de endotoxina. Determinar la MDV a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{MDV} = (\text{límite de endotoxina} \times \text{concentración de la } \textit{Solución Muestra})/(\lambda)$$

Límite de Endotoxina—El límite de endotoxina para medicamentos de administración parenteral, definido según la dosis, es igual a K/M , donde K es la dosis pirogénica umbral de endotoxina por kg de peso corporal y M es igual a la dosis máxima recomendada del producto, en bolo, por kg de peso corporal. Cuando el producto se va a inyectar a intervalos frecuentes o por infusión continua, M es la dosis máxima total administrada durante un periodo de una hora. El límite de endotoxinas para los medicamentos de administración parenteral se especifica en la monografía individual en unidades como UE/mL, UE/mg, UE/Unidad de actividad biológica, UE/dosis.

K es 5 UE/kg para administración parenteral; 0,2 UE/kg para administración intratecal; 175 UE/V para productos radiofarmacéuticos por vía parenteral (V: es la

dosis máxima recomendada en mL); 14 UE/V para productos radiofarmacéuticos por vía intratecal y 100UE/m² para preparaciones administradas por m² de superficie corporal en el cual *M* es la dosis máxima por m².

Concentración de la Solución Muestra

mg/mL: en el caso del límite de endotoxina especificado por peso (UE/mg);

Unidades/mL: en el caso del límite de endotoxina especificado por unidad de actividad biológica (UE/Unidad);

mL/mL: cuando el límite de endotoxina se especifica por volumen (UE/mL).

λ : la sensibilidad declarada en El método *de Coagulación* (UE/mL) o la concentración más baja usada en la curva estándar para el método *Turbidimétrico* o el método *Cromogénico*.

MÉTODO DE COAGULACIÓN

El método de coagulación se usa para detectar o cuantificar endotoxinas basándose en la coagulación del lisado empleado como reactivo en presencia de endotoxina. La concentración mínima de endotoxina requerida para hacer que el lisado se coagule en las condiciones estándar es la sensibilidad declarada del lisado empleado como reactivo. Para garantizar tanto la precisión como la validez del ensayo, efectuar los ensayos para confirmar la sensibilidad declarada del lisado y para determinar factores de interferencia según se describe en *Ensayos Preparatorios*.

Ensayos Preparatorios

Ensayo de Confirmación de la Sensibilidad Declarada del Lisado—Confirmar por cuadruplicado la sensibilidad declarada, λ , expresada en UE/mL del lisado antes de usarlo en El ensayo. El ensayo de confirmación de sensibilidad del lisado se debe llevar a cabo cuando se usa una partida nueva de lisado o cuando hay algún cambio

en las condiciones del ensayo que pueda afectar el resultado. Preparar soluciones estándar con al menos cuatro concentraciones equivalentes a 2,0 λ, λ, 0,5 λ y 0,25 λ, diluyendo el estándar de referencia de Endotoxina con *Agua para EEB*.

Mezclar un volumen del reactivo LAL con un volumen igual (como por ejemplo alícuotas de 0,1 mL) de la *Solución Estándar de Endotoxina* en cada tubo de ensayo. Incubar la mezcla de reacción durante un período constante según las instrucciones del fabricante del lisado (habitualmente a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 60 ± 2 minutos), evitando vibraciones. Para analizar la integridad del gel, sacar uno a uno los tubos directamente de la incubadora y con un único movimiento suave, invertirlos aproximadamente a 180° . Si se ha formado un gel firme que permanece en su lugar después de invertir los tubos, registrar el resultado como positivo. Un resultado es negativo si no se forma un gel intacto. El ensayo se considera válido cuando la concentración más baja de la solución estándar presenta un resultado negativo en todas las réplicas. El punto final es la concentración más baja en la serie de concentraciones decrecientes de endotoxina estándar que coagula el lisado. Determinar la media geométrica del punto final calculando la media de los logaritmos de las concentraciones en el punto final de la serie de cuatro réplicas y calculando luego el antilogaritmo de la media, según se indica en la siguiente fórmula:

$$\text{media geométrica de la concentración en el punto final} = \text{antilogaritmo } (\sum e/f)$$

donde $\sum e$ es la suma de los logaritmos de las concentraciones en el punto final de la serie de diluciones utilizadas, y f es el número de réplicas. La media geométrica de la concentración en el punto final es la sensibilidad medida del lisado (en UE/mL). Si la misma está comprendida entre 0,5- 2 λ se confirma la sensibilidad declarada.

Ensayos de Factores de Interferencia- El ensayo de inhibición o intensificación se debe repetir cada vez que se emplee un nuevo lote de *Reactivo LAL* o se modifique

la formulación del producto.

Llevar a cabo el ensayo sobre alícuotas de la muestra o sobre una dilución que no exceda la máxima dilución válida (MDV), en las cuales no exista endotoxina detectable. El ensayo se realiza sobre la muestra sin adición y con adición de endotoxina; en este caso, preparar las diluciones de muestra de manera de obtener concentraciones finales de endotoxina de 2,0 λ ; 1,0 λ ; 0,5 λ ; 0,25 λ . Probar en paralelo las mismas concentraciones de endotoxina en agua EEB y los controles negativos de éste. Ensayar cada solución al menos por cuadruplicado. Calcular la media geométrica de la concentración del punto final según el *Ensayo de confirmación de la sensibilidad del lisado*.

El ensayo sólo es válido si la sensibilidad del *Reactivo LAL*, determinada en presencia de la preparación ensayada, no difiere en más de un factor de 2 con respecto a la determinada en *Agua EEB* es decir, si la media geométrica de la concentración del punto final en la muestra con endotoxina es mayor o igual que 0,5 λ , y menor o igual que 2,0 λ . Si el análisis indica inhibición o intensificación repetir el ensayo empleando las muestras diluidas apropiadamente por un factor que no exceda la MDV. De este modo, para subsecuentes determinaciones de endotoxina en las muestras se debe emplear la dilución que no exceda la MDV y sea suficiente para superar la inhibición o intensificación. Otras formas de eliminar interferencias, además de las diluciones, pueden ser filtraciones, neutralizaciones, diálisis o adición de sustancias que desplacen la endotoxina adsorbida. El empleo de un *Reactivo LAL* de mayor sensibilidad permite realizar diluciones mayores de las preparaciones a ensayar y contribuye a la eliminación de interferencias. Si bajo las condiciones del ensayo de inhibición o intensificación son detectadas endotoxinas endógenas en las muestras no tratadas, las mismas pueden adecuarse separando la endotoxina presente por ultrafiltración, siempre y cuando esta metodología permita la separación de la endotoxina del producto.

Procedimiento - Transferir a sendos tubos de ensayo de 10 mm \times 75 mm, los volúmenes indicados (0,1 mL) de: controles negativos, las diluciones seleccionadas de *Endotoxina de referencia*, la muestra sin diluir y/o las diluciones de la muestra a

ensayar y los controles positivos de ésta/s (preparados por la adición de una concentración de endotoxina igual a $2,0 \lambda$), por duplicado. Agregar a cada tubo volúmenes iguales de *Reactivo LAL* reconstituido y agitar suavemente para mezclar. Incubar a 37 ± 1 °C durante 60 ± 2 minutos, evitando vibraciones. Después de la incubación retirar cada tubo cuidadosamente para su observación. Un resultado positivo (+) se caracteriza por la formación de un gel firme que se mantiene cuando se invierte el tubo 180° . Un resultado negativo (-) se caracteriza por la ausencia del gel o por la formación de un gel viscoso que no mantiene su integridad al invertir el tubo 180° .

Ensayo límite

Se aplica cuando el objetivo del ensayo es comprobar que el producto a ensayar presenta un contenido de endotoxinas menor al especificado en la monografía correspondiente. Se prepara la muestra o la dilución de la misma determinada en *Ensayo de inhibición o intensificación*, que no exceda la MDV. El control positivo de la muestra se prepara mediante el agregado de una concentración de endotoxina igual a $2,0 \lambda$. El control negativo es *Agua EEB*. Se prepara la dilución de *Endotoxina de referencia* a una concentración de endotoxina igual a $2,0 \lambda$. Cada solución debe realizarse por duplicado.

El ensayo sólo es válido cuando los controles negativos (-) y positivos (+) dan el resultado apropiado. La muestra cumple con el ensayo si el resultado de ambos duplicados de la muestra o dilución de ésta resulta negativo (-). No cumple si los duplicados resultan positivos (+). Repetir el ensayo si los duplicados no son coincidentes. Se puede repetir el ensayo hasta la MDV.

Ensayo Semicuantitativo

Si se desea obtener un resultado semicuantitativo, se realizan diluciones con concentraciones decrecientes, que correspondan a series geométricas donde el cociente de cada dilución con la inmediata siguiente es una constante. Preparar los controles positivos de la muestra con una dilución que no exceda la MDV y con el

agregado de una concentración de endotoxina igual a $2,0 \lambda$. Cada dilución de la muestra a ensayar debe hacerse al menos por duplicado, realizando en paralelo una serie duplicada de tubos de reacción de diluciones de *Endotoxina de referencia* con concentraciones de $2,0 \lambda$; $1,0 \lambda$; $0,5 \lambda$; $0,25 \lambda$ y los controles negativos de *Agua EEB*. El ensayo sólo es válido cuando los controles negativos (-) y positivos (+) dan el resultado apropiado y la media geométrica en el punto final de la *Endotoxina de referencia* es mayor o igual a $0,5 \lambda$, y menor o igual a $2,0 \lambda$.

Para determinar la concentración de endotoxinas de la *Solución Muestra*, calcular la concentración en el punto final para cada repetición multiplicando cada factor de dilución del punto final por λ . La concentración de endotoxinas en la *Solución Muestra* es la concentración del punto final de las réplicas. Si el ensayo se realiza con una *Solución Muestra* diluida, calcular la concentración de endotoxinas en la *Solución Muestra* original multiplicando por el factor de dilución. Si ninguna de las diluciones de la *Solución Muestra* es positiva en un ensayo válido, informar la concentración de endotoxina como menor que λ (si se analizó la muestra diluida, informar como menor que λ multiplicado por el factor de dilución más bajo de la muestra). Si todas las diluciones son positivas, la concentración de endotoxina se informa como igual o mayor que el factor de dilución mayor por λ . La preparación cumple con los requisitos del ensayo si la concentración de endotoxinas en ambas determinaciones repetidas es menor que la especificada en la monografía individual.

MÉTODOS FOTOMÉTRICOS CUANTITATIVOS

Método Turbidimétrico

Consiste en una valoración fotométrica que mide los incrementos en turbidez del reactante. Dependiendo del principio empleado en la valoración, éste método se puede clasificar como valoración turbidimétrica de punto final o valoración turbidimétrica cinética. La valoración turbidimétrica de punto final se basa en la relación cuantitativa entre la concentración de endotoxinas y la turbidez (absorbancia

o transmitancia) de la mezcla de reacción al término de un período de incubación. La valoración turbidimétrica cinética es un método para medir el tiempo necesario para alcanzar una absorbancia o transmitancia predeterminada de la mezcla de reacción (tiempo de iniciación) o la velocidad de desarrollo de turbidez. El ensayo se efectúa a la temperatura de incubación recomendada por el fabricante del lisado (por lo general $37 \pm 1^\circ\text{C}$).

Método Cromogénico

Consiste en una valoración para medir el cromóforo, liberado de un péptido cromogénico adecuado, por la reacción de las endotoxinas con el lisado. Dependiendo del principio empleado en la valoración, éste método se puede clasificar como valoración cromogénica de punto final o valoración cromogénica cinética. La valoración cromogénica de punto final se basa en la relación cuantitativa entre la concentración de endotoxinas y la liberación del cromóforo al término de un período de incubación. La valoración cromogénica cinética es un método para medir el tiempo (tiempo de iniciación) necesario para alcanzar una absorbancia predeterminada de la mezcla de reacción o la velocidad de desarrollo de color. El ensayo se efectúa a la temperatura de incubación recomendada por el fabricante del lisado (por lo general $37 \pm 1^\circ\text{C}$).

Ensayos Preparatorios

Con el fin de garantizar la precisión o validez de los métodos turbidimétricos y cromogénicos, se realizan los ensayos preparatorios para verificar que los criterios para la curva estándar son válidos y que la *Solución Muestra* no interfiere con el ensayo. Cuando cambian las condiciones que pueden influir en el resultado del ensayo es necesaria la validación del mismo.

Garantía de los Criterios para la Curva Estándar—El ensayo se debe efectuar para cada lote de lisado empleado como reactivo. Utilizando la *Solución Estándar de Endotoxina*, preparar por lo menos tres concentraciones de endotoxina por

triplicado dentro del intervalo indicado por el fabricante del lisado para generar la curva estándar. Si el intervalo deseado en los métodos cinéticos es mayor de dos logaritmos, se deben incluir concentraciones adicionales de estándar para que cada aumento logarítmico esté comprendido en el intervalo de la curva estándar. El valor absoluto del coeficiente de correlación (r) debe ser mayor o igual a 0,980 para el intervalo establecido de concentraciones de endotoxina.

Ensayo para Factores de Interferencia—Seleccionar una concentración de endotoxina en o cerca del centro de la curva estándar de endotoxina. Preparar las siguientes soluciones: Solución A, solución Muestra sin endotoxina, se puede diluir sin que exceda la MDV; Solución B, *Solución Muestra* con una concentración de endotoxina que se corresponda con la porción central de la curva; Solución C, al menos tres concentraciones de endotoxinas (diluidas en agua EEB), siendo la más baja λ ; Solución D, agua para EEB sin endotoxinas. Llevar a cabo los ensayos de las *Soluciones A, B, C y D* al menos por duplicado, de acuerdo con las instrucciones del lisado empleado

El ensayo se considera válido cuando se cumplen las siguientes condiciones: 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.

Calcular la recuperación media de la endotoxina agregada restando la concentración media de endotoxina en la solución, si la hubiera (*Solución A*) de la que contiene la endotoxina agregada (*Solución B*). Para considerar que no presenta factores que interfieran con la valoración en las condiciones del ensayo, la concentración medida de endotoxina agregada a la *Solución Muestra* debe estar entre 50%-200%, de la concentración conocida de endotoxina agregada después de restar la endotoxina detectada en la solución sin endotoxina agregada.

Cuando la recuperación de endotoxina se encuentra fuera de los intervalos

especificados, se considera que la *Solución Muestra* en análisis contiene factores de interferencia. Luego, repetir el ensayo usando una dilución mayor que no exceda la MDV. Además, la interferencia de la *Solución Muestra* o de la *Solución Muestra* diluida que no exceda la MDV se puede eliminar mediante un tratamiento validado apropiado, como filtración, neutralización, diálisis o calentamiento. Para establecer que el tratamiento elegido elimina eficazmente la interferencia sin pérdida de endotoxinas, realizar la valoración descrita anteriormente utilizando la preparación a examinar, a la que se ha agregado endotoxina estándar y se ha sometido posteriormente al tratamiento seleccionado.

Seguir el procedimiento descrito anteriormente para *Ensayo de Factores de Interferencia en Ensayos Preparatorios*.

Calcular la concentración de endotoxina de cada una de las determinaciones repetidas de la *Solución A* usando la curva estándar generada con la *Solución C* de control positivo. El ensayo se considera válido cuando se cumplen las siguientes condiciones: los resultados de la *Solución C* de control cumplen con los requisitos de validación definidos en *Garantía de Criterios para la Curva Estándar*, en *Ensayos Preparatorios*; la recuperación de endotoxina, calculada a partir de la concentración encontrada en la *Solución B* después de restar la concentración de endotoxina encontrada en la *Solución A*, está dentro del intervalo de 50%-200% y el resultado de la *Solución D* de control negativo no excede el límite del valor del blanco requerido en la descripción del lisado empleado o es menor que el límite de detección de endotoxina del lisado empleado como reactivo.

En las valoraciones fotométricas, la muestra cumple con el ensayo si la concentración media de endotoxinas de las determinaciones repetidas de la *Solución A*, después de la corrección por dilución y concentración, es menor que el límite de endotoxina especificado para el producto.