

Ensayo cuantitativo de endotoxina del agua ultrapura

Por: Katrin Toepfner y Dr. Elmar Herbig

*Los componentes de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, como por ejemplo **E. coli** y *Pseudomonas*, son denominados como endotoxinas, poseen un componente polisacárido hidrófilo y un componente lípido lipofílico y, a diferencia de las bacterias de las cuales se originan, son altamente estables al calor y al pH. Las endotoxinas pertenecen a los pirógenos, es decir, pueden causar fiebre si entran en contacto con las membranas mucosas o en el flujo sanguíneo (con referencia a Steck, 2006, [1]).*

Con base en las farmacopeas actuales, no se pueden exceder los valores límites definidos para el contenido de endotoxinas durante el proceso de fabricación de productos farmacéuticos.

En los cultivos de células mamíferas que se utilizan para producir productos biofarmacéuticos, como inmunoglobulinas, la presencia de las endotoxinas puede llevar a la muerte celular. Por esa razón, se deben utilizar los medios ultrapuros, es decir, el agua ultrapura, con niveles comprobadamente inferiores a los límites para producir productos biofarmacéuticos o propagar líneas celulares o cultivos celulares.

El objetivo de este estudio es demostrar que el agua ultrapura producida por el Sistema arium pro VF exhibe un contenido de endotoxinas que es inferior a los productos biofarmacéuticos, y puede ser utilizada para las aplicaciones de las categorías mencionadas anteriormente.

Prueba de endotoxinas

Un método para la detección de endotoxinas es la prueba del LAL (Lisado de Amebocitos de Limulus), la cual utiliza la reacción de la coagulación de un lisado de amebocitos aislados del cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus*). Esa reacción involucra una cascada de coagulación evolutiva primitiva en la cual las proteasas son secuencialmente activadas, lo que resulta en la formación de un coágulo.

La cascada de coagulación (también llamada de Cascada Enzimática de Limulus, véase [2], [3]) puede ser desencadenada por las endotoxinas o alternativamente por los β -glucanos, que son polisacáridos de cadena corta encontrados en las paredes celulares de levaduras y mohos. La vía del β -glucano puede llevar a resultados falso-positivos [1]. Con base en la coagulación, el lisado incoloro líquido reacciona por coagulación para formar un gel lechoso sólido, de ahí el término "método del coágulo gelatinoso (gel-clot)". Como la sensibilidad del lisado es extremadamente alta, es imprescindible descartar una reacción falso-positiva causada por la contaminación con endotoxinas o β -glucano. Por esa razón, exigencias de pureza excepcionalmente altas deben ser establecidas para el agua ultrapura.

Además del método del coágulo gelatinoso, también se puede analizar el contenido de endotoxinas utilizándose un método cromogénico cuantitativo. En ese método, un péptido cromogénico sintético, un sustrato cromogénico, es añadido al lisado. Mientras que un coágulo gelatinoso es formado por la enzima de coagulación en el método del coágulo gelatinoso, en el método cromogénico el sustrato cromogénico sintético es dividido por la enzima de coagulación, resultando en un cambio de color para el amarillo. La intensidad de la coloración amarilla está directamente relacionada con el contenido de la endotoxina de la muestra (prueba cromogénica). La preparación del lisado, sea para el coágulo gelatinoso o para el método cromogénico, debe ser hecha utilizándose el agua ultrapura.

Descripción del Sistema de agua ultrapura arium® pro VF



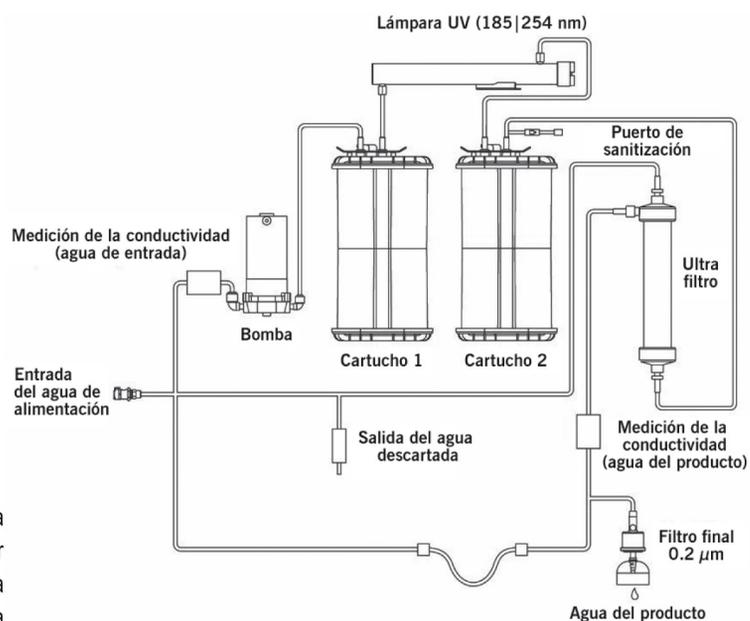
Figura 1: Sistema del agua ultrapura arium® pro VF (foto cortesía de Sartorius).

El sistema arium® pro VF (Figura 1) fue diseñado para producir agua ultrapura a partir de agua potable previamente tratada y remover cualquier contaminante todavía presente en esa agua potable. La producción del agua ultrapura requiere recirculación continua y tasa de flujo de agua constante, lo que se logra utilizando un sistema de bomba con presión controlada. La conductividad del agua se mide en la entrada del agua de alimentación y en el puerto de descarga, o la salida de agua del producto.

El sistema utilizado en las pruebas descritas en este documento opera con dos cartuchos diferentes, mismos que se llenan con un absorbente de carbón activo especial y resinas de intercambio iónico de lecho mixto para proporcionar agua ultrapura con bajo contenido de COT. Además, la unidad tiene una lámpara UV integrada que posee un efecto bactericida y oxidante en las longitudes de onda de 185 y 254 nm, respectivamente.

Adicionalmente, el sistema de agua ultrapura arium® posee un módulo de ultrafiltro incorporado utilizado como un filtro de flujo tangencial. La membrana del ultrafiltro utilizada en este filtro retiene coloides, microorganismos, endotoxinas, ARN y ADN. Un filtro final de 0,2 µm instalado en la salida de agua sirve para retirar el material particulado y las bacterias durante la dispensación del flujo del agua ultrapura producida. El proceso que la unidad emplea para producir agua ultrapura se encuentra en la Figura 2 (diagrama de flujo para arium® pro VF).

Figura 2: Diagrama esquemático de flujo para el sistema de agua ultrapura arium® pro VF (para mayor claridad, las válvulas y sus controladores son omitidos).



Métodos de prueba

En las pruebas realizadas para analizar el contenido de endotoxinas en el agua ultrapura obtenida de arium® pro VF, se llevaron a cabo tanto el método del coágulo gelatinoso como el cromogénico.

Método del coágulo gelatinoso

Se disolvió el lisado liofilizado (Charles River Endosafe R 15006) en el agua ultrapura obtenida del sistema arium® pro VF y se lo congeló en porciones en tubos de ensayo exentos de pirógenos. Se preparó una serie estándar de endotoxina consistiendo en LPS E. Coli 055:B5 (Lonza N 185) en concentraciones de 0,001 UE/ml a 25 UE/ml utilizándose agua ultrapura del sistema arium® pro VF.

Se analizó el lisado disuelto utilizándose el estándar de endotoxina preparado para verificar que tenía la sensibilidad indicada (0,06 UE/ml). Se pipeteó una muestra de 100 µl en 100 µl del lisado y se incubó en baño maría a 37°C. Después de una hora, se retiró individualmente cada tubo del baño maría, se giró 180° y se evaluó para la formación del coágulo gelatinoso.

Método cromogénico

Se disolvió el sustrato cromogénico (Charles River Endochrome K R1710K) en el agua ultrapura producida por el sistema arium® VF. Se pipetearon ese sustrato cromogénico y las muestras estándares de endotoxina en placas de 96 pocillos exentas de endotoxinas, en una proporción de 1:1. Se midió continuamente la absorción de cada muestra en intervalos de 1 minuto por más de una hora a 405 nm, utilizándose un lector de placas TECAN Safire a 37°C.

Resultados

En el rango de 0,001 UE/ml a 0,05 UE/ml, el método del coágulo gelatinoso mostró un resultado negativo, es decir, ninguna formación de coágulo gelatinoso (ninguna endotoxina detectada; véase la tabla 1). Una concentración $\geq 0,1$ UE/ml resultó en la formación de un coágulo gelatinoso. Ese resultado muestra que dentro de los límites de sensibilidad de detección del método del coágulo gelatinoso, ninguna endotoxina estaba presente en el agua ultrapura filtrada por arium® pro VF.

Las 60 lecturas de absorción a 405 nm (Figura 3) en el método cromogénico produjeron curvas con pendientes diferentes, dependiendo del contenido específico de endotoxina de las muestras estándar. Utilizándose un programa de computadora especial, se determinaron los tiempos que eran necesarios para alcanzar una absorción específica y éstos fueron utilizados como la base para extrapolar las muestras con un contenido de endotoxina desconocido (para valores, véase la Tabla 1 - ensayo cromogénico). Como las muestras estándar con las concentraciones más bajas (0,005 y 0,001 UE/ml) y el agua arium® no alcanzaron el valor de extinción de 1 requerido para calcular el contenido de endotoxina, fueron evaluados como inferiores al límite de detección.

Los valores alcanzados con el agua ultrapura arium® pro VF fueron considerablemente más bajos que los trazados para la curva de 0,001 UE/ml.

La Figura 4 muestra los datos colectados sobre las concentraciones de endotoxina en el agua del grifo, agua desionizada y agua arium® en comparación con dos estándares de endotoxina seleccionados (0,05 UE/ml y 0,005 UE/ml).

Se calculó el contenido de endotoxina en las muestras de agua a partir de los valores medidos, utilizando los estándares de endotoxina. Eso se lo demuestra la tabla 2.

Tabla 1: Ensayo del contenido de endotoxina en el agua ultrapura arium® pro VF y muestras estándar de endotoxina utilizando el método del coágulo gelatinoso y el método cromogénico.

Muestra	Preparado estándar de endotoxina [UE/ml]*	Coágulo gelatinoso	Ensayo cromogénico [UE/ml]*
Agua ultrapura arium® pro VF	0	No	0**
Estándar de endotoxina	0,001	No	0**
Estándar de endotoxina	0,005	No	0**
Estándar de endotoxina	0,01	No	0,009
Estándar de endotoxina	0,05	No	0,055
Estándar de endotoxina	0,1	Si	0,083
Estándar de endotoxina	0,5	Si	0,63
Estándar de endotoxina	1,0	Si	1,2
Estándar de endotoxina	5,0	Si	4,47
Estándar de endotoxina	10	Si	8,4
Estándar de endotoxina	25	Si	25

* UE/ml, unidad de endotoxina; 1 UE corresponde aproximadamente a 100 picogramos de endotoxina (como regla general).

** Inferior al límite de detección cuantificable.

Figura 3: Lecturas de absorción para muestras estándar de endotoxina en un periodo de 60 minutos utilizando el método cromogénico.

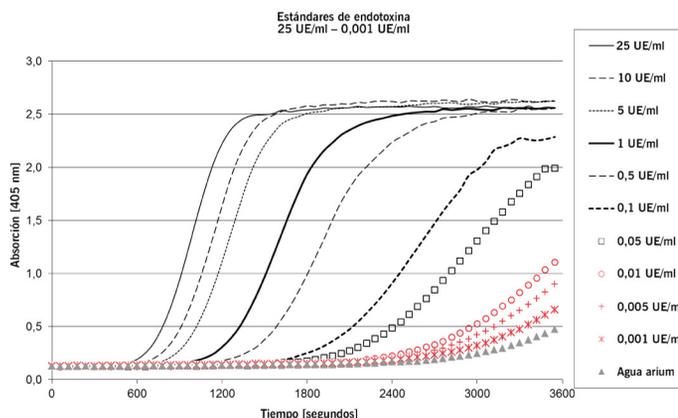
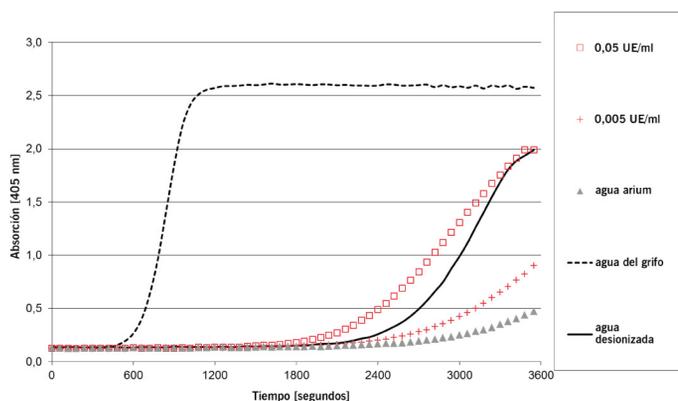


Figura 4: Ensayo de endotoxina de las muestras de aguas.



Discusión

Los resultados de las pruebas muestran que el agua ultrapura producida por el sistema arium® pro VF puede de inmediato ser utilizada como una alternativa asequible para preparar las muestras que serán analizadas en las pruebas de endotoxina, ya que las concentraciones detectables de endotoxina en el agua ultrapura producida son excepcionalmente bajas (<0,001 UE/ml). Los resultados obtenidos confirman las pruebas anteriores en que se encontró la carga de endotoxina de <0,001 UE/ml en el agua ultrapura arium® [4].

La concentración de endotoxina en el agua ultrapura arium® pro VF es muy inferior a los límites requeridos por la Farmacopea de los Estados Unidos, lo que hace esa agua más teóricamente adecuada para el uso en la fabricación/monitoreo de endotoxinas de los productos farmacéuticos. Ejemplos de tales usos son las formulaciones de productos, soluciones de diafiltración, tampones de cromatografía y agua para etapas de extracción, lavado y sanitización, así como para las soluciones de cultivo de células.

Precisamente en el ámbito de las aplicaciones de cultivo de células hay que prestar atención a contaminaciones en las diversas etapas de esos procesos. Para mantener el control sobre los efectos de las endotoxinas en esos cultivos y en la sensibilidad de las células, particularmente con relación a tales endotoxinas, los medios para el crecimiento celular deben ser demostrablemente exentos de endotoxinas detectables (véase también [5]).

Agradecimientos

Nuestro especial agradecimiento a la Dra. Stephanie Steck de Rentschler Biotechnologie GmbH, Laupheim, Alemania, por la revisión del manuscrito de este documento y por su constructivo debate sobre este tema.

Bibliografía:

1. Steck, S. Endotoxine und ihre Bedeutung bei R & D Applikationen. Bioforum 6/2006.
2. Endosafe® -PTS™ Glucan Assay, Charles River Laboratories International, Inc, 2009.
3. Endotoxin Compendium, V 2.11, Hyglos GmbH, Bernried, Germany.
4. Untersuchungsbericht Fresenius Medical Care, Deutschland GmbH, Werk St. Wendel, 2007.
5. Dawson, M.E. LAL Update von Associates of Cape Cod Incorporated, March 1998, Vol. 16, No. 1.

Adaptado al artículo original alemán del Dr. Dr. Herbig, 7 de junio de 2012.

Autores

Katrin Toepfner, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Alemania y Dr. Elmar Herbig, Sartorius Weighing Technology GmbH, Goettingen.

Contacto:

Sartorius de México S.A. de C.V.
Tel: +52 (55) 5562-1102
atencionacientes.MX@sartorius.com
www.sartorius.com/es