

Reducción del uso de LAL en el ensayo de endotoxinas

Hayden Skalski | May/June 2023



En los últimos años se han producido importantes mejoras y avances en la tecnología farmacéutica con respecto a las pruebas de control de calidad. Una prueba que entra en esta categoría es la del lisado de amebocitos de Limulus (LAL), que detecta endotoxinas bacterianas, un pirógeno nocivo, en el agua y los productos farmacéuticos finales. Las pruebas fotométricas tradicionales de LAL que incluyen el ensayo en microplaca de 96 pocillos para pruebas turbidimétricas cinéticas y cromogénicas- cinéticas son lentas y requieren mucho tiempo de trabajo. Ahora, con el uso de microflúidos, la manipulación de líquidos y el tiempo de trabajo pueden reducirse significativamente, junto con una reducción de los volúmenes de LAL y de muestra, cumpliendo con la normativa vigente.

¿Qué cantidad de lisado se necesita para realizar ensayos acordes a la normativa?

Las pruebas de LAL tradicionales utilizan microplacas de 96 pocillos que tienen una forma específica para cada pocillo y una longitud de trayectoria para la absorbancia. La longitud del trayecto de una microplaca de 96 pocillos varía ligeramente en función del fabricante o proveedor. Esto se debe a que el pocillo de una microplaca de 96 pocillos de fondo plano es a menudo un cono truncado, hecho para facilitar el desmoldeo.¹

Debido a la profundidad y forma de los pocillos, los fabricantes de LAL especifican cuánto volumen de muestra y reactivo de LAL se necesita en cada pocillo para mantener una relación 1:1 para la detección de endotoxinas. Los ensayos cinéticos de endotoxinas se basan en una relación inversa entre el cambio en la densidad óptica (DO) y la concentración de endotoxinas. La DO es la "medida de la cantidad de luz absorbida por una suspensión o una solución de una molécula orgánica a una longitud de onda específica, medida por un espectrofotómetro".²



La proporción entre muestra y lisado (1:1) es muy importante. La mayoría de los fabricantes de LAL recomiendan utilizar 100 µl de muestra por 100 µl de LAL para lectores de microplacas de 96 pocillos y lectores de tubo. Hay algunos lisados que utilizan menos de 100 µl de muestra y lisado, y éstos se utilizan normalmente en microplacas que tienen pocillos más pequeños. Sin embargo, se sigue manteniendo la proporción 1:1. Se ha demostrado durante años que esta proporción 1:1 proporciona resultados precisos para BET. El uso de 100 µl de muestra y lisado no es un requisito reglamentario ni de la farmacopea. Se trata más bien de una recomendación sobre la cantidad de volumen que se debe utilizar para cumplir la proporción 1:1 dado el tamaño de los pocillos de un lector de microplacas o tubos para que la longitud del trayecto y la absorbancia deseadas alcancen la densidad óptica.



El sistema de microfluidos permite realizar pruebas de endotoxinas precisas, fiables y conformes a la normativa utilizando volúmenes de reactivo más pequeños

En los últimos años han surgido nuevas innovaciones para los ensayos de LAL, como la plataforma Sievers Eclipse BET. El analizador Eclipse utiliza tecnología microfluidica y fuerza centrípeta para suministrar con precisión pequeños volúmenes de líquido a los segmentos específicos de la microplaca, reduciendo así drásticamente la cantidad de reactivo necesario y simplificando la configuración. Los microfluidos ha sido un campo de investigación próspero durante más de 30 años debido a su capacidad para satisfacer la demanda de análisis químicos y biológicos precisos, rentables, fiables y sensibles, que es exactamente lo que se necesita en los ensayos BET.

Centripetal Microfluidics for LAL Testing

Does	Does not
<ul style="list-style-type: none">• Comply with global compendia• Drastically improve ease of use• Reduce hands-on time / pipetting• Reduce amount of training• Reduce environmental contamination• Precisely measure and distribute liquids in 1:1 sample to lysate ratio• Decrease amount of LAL, LAL Reagent Water (LRW), and sample• Use commercially available LAL• Allow for scalability	<ul style="list-style-type: none">• Alter the biochemistry of BET assays• Require significant setup time or complicated pipetting• Need standard curve or PPC prep• Require complex equipment or a large amount of space• Require complex validation• Require significant training• Require in-depth maintenance• Need to be monitored by an analyst at all times





El Microplato de Eclipse tiene una curva estándar incrustada en cinco segmentos, y cada estándar tiene su propio control negativo. Hay 21 segmentos de muestra que permiten al usuario ejecutar hasta 21 muestras en una placa, de forma similar a un lector de microplacas de 96 pocillos. Cada uno de los segmentos de muestra contiene endotoxina para el control positivo del producto.

Dado que la tecnología de microfluidos requiere volúmenes de reacción más pequeños pero no altera la bioquímica, la tecnología de la microplaca de Eclipse está diseñada para usar menos lisado que los métodos tradicionales, cumpliendo estrictamente con farmacopea. La densidad óptica del Eclipse se calculó utilizando la Ley de Beer-Lambert, la cual establece que "la concentración de una solución química es directamente proporcional a su absorción de luz"³. **Eclipse solo requiere 1 ml de lisado y garantiza una proporción de 1:1 de muestra a lisado para cada ensayo.**

Garantizar un rendimiento equivalente del Sievers Eclipse al de los lectores de microplacas tradicionales

Durante el desarrollo del Eclipse se realizaron pruebas exhaustivas para garantizar un rendimiento equivalente al de un lector de microplacas de 96 pocillos. La Farmacopea de los Estados Unidos describe en el capítulo <1225> los parámetros que deben tenerse en cuenta al validar un método analítico. El rendimiento del sistema Eclipse se evaluó midiendo diferentes parámetros descritos en USP <1225>.

Tabla 1. Criterios USP <1225> y Eclipse de Sievers

Parámetro de validación	Sievers Eclipse
Exactitud	✓
Precisión	✓
Linealidad	✓
Límite de detección (LOD)	✓
Rango superior	✓
Especificidad	✓
Idoneidad del sistema	✓
Equivalencia con una placa de 96 pocillos	✓
Uniformidad del pozo	✓
Contaminación de fondo	✓
Verificación de la relación 1:1 (robustez)	✓

Las pruebas se realizaron con múltiples lotes de LAL de diferentes proveedores a lo largo de varios años. Además del agua de reactivo LAL, se analizaron muestras de fármacos tanto en el Eclipse como en un lector de microplacas de 96 pocillos. Los datos mostraron que el rendimiento del Eclipse era equivalente al del lector de microplacas tradicional. En conclusión, el Eclipse utiliza un lisado cinético-cromogénico para realizar una prueba de endotoxinas conforme a la normativa. Los datos de validación según USP <1225> muestran que el Eclipse es equivalente al lector de microplacas de 96 pocillos.





Referencias

1. Sievers Analytical Instruments. Determinación de valores equivalentes de densidad óptica (DO) de inicio en la plataforma Sievers Eclipse BET.
2. McCullough, Karen Zink. La prueba de las endotoxinas bacterianas: A Practical Approach. DHI Publishing, LLC, 2011.
3. Helmenstine, Anne Marie. Definición y ecuación de la ley de Beer. ThoughtCo, 2019. <https://www.thoughtco.com/beers-law-definition-and-equation-608172>



Autor del artículo: Hayden Skalski
Veolia Water Technologies & Solutions, Sievers Instruments

Publicación: American Pharmaceutical Review | May/June 2023
<https://lc.cx/kpRzXw>

Traducido por instrumentación analítica, s.a.

