



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Pruebas *in vitro* (*Limulus Amebocyte Lysate* test (LAL) y Prueba de Activación de Monocitos (MAT)) como sustitutos de la prueba de pirógenos en conejos, para sueros antiofídicos: Revisión de alcance**

**Gladys Andrea Saavedra Orjuela**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química Farmacéutica  
Bogotá, Colombia

2023

# **Pruebas *in vitro* (*Limulus Amebocyte Lysate* test (LAL) y Prueba de Activación de Monocitos (MAT)) como sustitutos de la prueba de pirógenos en conejos, para sueros antiofídicos: Revisión de alcance**

**Gladys Andrea Saavedra Orjuela**

Tesis de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Magíster en Ciencias- Farmacología**

Director:

Jesús Becerra Camargo Msc, PhD

Codirector

Milton Josué Crosby PhD

Línea de Investigación

Educación Sanitaria

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2023

## *Dedicatoria*

*A mi madre, ya que este triunfo es suyo, por su lucha constante y compromiso permanente con nuestra familia. Sigo sus pasos, porque son el mejor ejemplo que me ha brindado Dios a lo largo de mi vida. A mi abuela y mis hermanas, grandes apoyos día a día. A Mi esposo, quien es para mí un gran modelo de responsabilidad, disciplina y tenacidad. Ellos son, y siempre serán, lo más valioso para mí. Cada logro alcanzado, lo que soy y seré, es por ellos. A Dios, que me dio esta gran oportunidad de vida.*

# Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto). Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Gladys Andrea Saavedra Orjuela

Fecha: 30/01/2023

## **Agradecimientos**

Mi agradecimiento inicial es a Dios. Pues gracias a Él, no sólo pude lograr cumplir esta meta, si no que puedo respirar, estudiar, compartir con mi familia, y seguir creciendo día a día. Estoy agradecida infinitamente con el Dr. Jesús Becerra y el Dr. Crosby, quienes guiaron la dirección de este trabajo y fueron fundamentales para su realización. Sus consejos y sugerencias engrandecieron la elaboración exitosa. También, mis más sinceros agradecimientos con el Dr. Miguel Ángel Torres Wilches, quien con su amabilidad y paciencia brindó todo el apoyo necesario para iniciar esta propuesta. Así mismo, estoy completamente agradecida con otros grandes maestros de la Universidad Nacional de Colombia, como el Dr. Hernando Gaitán, cuya guía para la elaboración de esta revisión de alcance fue vital. Su grandiosa experiencia es enriquecedora para todos sus estudiantes. A los doctores Luis Fernando Ospina y Carlos Maldonado, cuyos consejos fueron completamente enriquecedores para mí, no sólo durante mis estudios de maestría, sino también para el desarrollo de este trabajo. Finalmente, quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a la Química Farmacéutica Daniela Sedano, quien muy amablemente aportó de forma significativa como revisora, para la realización de esta revisión de alcance.

## Resumen

### **Pruebas *in vitro* (*Limulus Amebocyte Lysate* test (LAL) y Prueba de Activación de Monocitos (MAT)) como sustitutos de la prueba de pirógenos en conejos, para sueros antiofídicos: Revisión de alcance**

**Introducción:** El análisis de pirógenos es una de las pruebas en el control de calidad durante la producción y liberación de productos inyectables. El efecto en la salud humana está asociado con las consecuencias fisiopatológicas que generan las endotoxinas bacterianas que pueden ocasionar la muerte de pacientes. **Objetivo:** Describir y evaluar críticamente el estado actual del conocimiento sobre la capacidad de las pruebas *in vitro* Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) y el Test de Activación de Monocitos (MAT), versus el modelo animal para evaluar pirogenicidad en sueros antiofídicos. **Metodología:** Revisión de alcance en Wiley, Scopus, LILACS, Google Scholar, PubMed, y Cochrane Library de artículos publicados hasta el 01 de julio de 2022, siguiendo las recomendaciones PRISMA. Los artículos incluidos se clasificaron según criterios de inclusión y exclusión. Fueron incluidos artículos publicados en revistas científicas, estudios de revisión y observacionales cuyos desenlaces y objeto de estudio se relacionaron con el objeto de la investigación. Se extrajeron datos y sintetizó la evidencia. **Resultados:** Se identificaron 746, de los cuales se excluyeron 671 por no estar en relación con el objeto de la revisión, 60 artículos sin comparador y duplicados, 5 aplicaban otras pruebas y 3 no accesibles. Fueron seleccionados 7 artículos para la revisión y análisis. **Conclusión:** La evidencia disponible de las pruebas *in vitro* MAT y LAL como sustitutos de la prueba *in vivo* RPT para evaluar pirógenos en sueros antiofídicos genera aún controversia. Es necesario realizar más estudios que comparen directamente 2 o más pruebas de pirógenos y su uso en anti venenos ofídicos. El uso de LAL durante la fabricación de anti venenos y realizar la prueba RPT para la liberación de productos finales podría ser complementaria.

**Palabras clave:** Suero antiofídico, pirógenos, prueba de pirogenicidad en conejos, prueba de LAL, prueba de MAT.

## Abstract

*In vitro* tests (*Limulus Amebocyte Lysate* test (LAL) and Monocyte Activation Test (MAT)) as substitutes for the pyrogen test in rabbits, for antivenom sera: Systematic scoping review

**Introduction:** Pyrogen analysis is one of the quality control tests during the production and release of injectable products. The effect on human health is associated with the pathophysiological consequences generated by bacterial endotoxins that can cause the death of patients. **Objective:** To describe and critically evaluate the current state of knowledge on the capacity of the *in vitro* tests of *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) and the Monocyte Activation Test (MAT), versus the animal model to assess pyrogenicity in antivenom sera. **Methodology:** Systematic scoping review in Wiley, Scopus, LILACS, Google Scholar, PubMed, and Cochrane Library of articles published up to July 1, 2022, following PRISMA recommendations. The included articles are classified according to inclusion and exclusion criteria. Articles published in scientific journals, review and observational studies were included, whose outcomes and object of study were related to the object of the investigation. Data was extracted and evidence synthesized. **Results:** 746 were identified, of which 671 were excluded because they were not related to the object of the review, 60 articles were not compared and duplicated, 5 applied other tests and 3 were not accessible. 7 articles were selected for review and analysis. **Conclusion:** The available evidence of the *in vitro* MAT and LAL tests as substitutes for the *in vivo* RPT test to evaluate pyrogens in antivenom sera is still controversial. Further studies are needed to directly compare 2 or more pyrogen tests and their use in ophidian antivenoms. The use of LAL during the manufacture of anti-venoms and the performance of the RPT test for the release of final products could be complementary.

**Key words:** Anti-venom serum, pyrogens, rabbit pyrogenicity test, LAL test, MAT test.

## Tabla de Contenido

Resumen .....	6
Abstract .....	7
Tabla de Contenido .....	8
Lista de Figuras .....	12
Lista de Tablas .....	13
Lista de Abreviaturas .....	14
Introducción .....	16
Justificación y planteamiento del problema .....	22
Hipótesis .....	25
Pregunta de investigación .....	25
Hipótesis .....	25
Hipótesis nula .....	25
Hipótesis alterna .....	25
Objetivos .....	26
General .....	26
Específicos .....	26
Marco Teórico .....	27
Accidente ofídico .....	27



---

Clasificación del envenenamiento según el género de la serpiente causante .....	28
Envenenamiento Bothrópico.....	28
Envenenamiento Lachésico.....	29
Envenenamiento Crotálico.....	30
Envenenamiento Elapídico o Micrúrico.....	31
Envenenamiento por Colubridos.....	32
Dosificación de antivenenos en accidentes ofídicos.....	32
Sueros antiofídicos .....	33
Reacciones Adversas .....	37
Proceso de fabricación de antivenenos .....	39
Control de calidad en sueros antiofídicos .....	40
Pirógenos .....	43
Tipos de pirógenos .....	43
Endotoxinas.....	44
Fiebre .....	47
Termorregulación biológica .....	47
Mecanismo de acción de los pirógenos para producir la fiebre .....	48
Reactivo <i>Limulus Amebocyte Lysate polyphemus</i> (LAL) .....	49
Validación .....	50
Límite de endotoxina .....	52
Máxima dilución válida (MDV) .....	52
Métodos de las pruebas de LAL .....	53
Factores de inhibición en la prueba de LAL.....	56
Falsos positivos .....	57

---

Potenciación .....	57
Inhibición .....	57
Monocyte Activation Test (MAT).....	58
Incubación de sangre criogénica .....	59
Interleuquina 1 $\beta$ y ELISA.....	60
Análisis .....	60
Prueba de pirógenos en conejos por la USP (United States Pharmacopeia) Oficial 01 mayo 2011 .....	60
Aparatos y diluyentes .....	60
Registro de la temperatura .....	61
Animales de prueba.....	61
Procedimiento.....	62
Interpretación y continuación de la prueba .....	63
Otras consideraciones.....	63
Equipos, materiales y reactivos que se usan en las pruebas de conejos y de LAL .....	64
Lisado de Amebocitos .....	66
Metodología.....	67
I. PLANIFICACIÓN DE LA REVISIÓN DE ALCANCE: .....	67
II. ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN.....	68
III. METODOLOGÍA PARA LLEVAR A CABO LA REVISIÓN:.....	68
Resultados.....	73
Búsqueda y selección de la evidencia .....	73
Tamizaje de referencias y selección de estudios.....	74
Descripción de los estudios .....	74
Comparación conjunta de pruebas RPT, LAL y MAT .....	79

---

Valoración de la calidad de los estudios.....	81
Síntesis de la evidencia .....	81
Resultados de los artículos incluidos.....	82
Número de estudios.....	82
Año de publicación de los estudios.....	82
Países de elaboración de estudios .....	82
Farmacopeas usadas como base.....	82
Discusión.....	83
Prueba <i>in vivo</i> en conejos (RPT) .....	83
Prueba de LAL.....	85
Prueba MAT.....	86
Comparación conjunta de pruebas RPT, LAL y MAT .....	87
Calidad de los artículos seleccionados.....	88
Discusión de los artículos incluidos .....	88
Desafíos Técnico-Regulatorios.....	89
Limitaciones de éste estudio .....	90
Conclusiones .....	91
Conflictos de interés y financiación .....	92
Anexo: Revisión y clasificación de artículos incluidos en la revisión .....	94
Glosario .....	102
Bibliografía.....	104

## Lista de Figuras

Figura 1. Estructura de la Inmunoglobulina G indicando sus fracciones..	36
Figura 2. Esquema general de producción de sueros antiofídicos en Colombia .....	40
Figura 3. Localización del hipotálamo en la cabeza del ser humano .....	44
Figura 4. Estructura de una endotoxina (muestra las 3 regiones Antígeno O, Oligosacárido, KDO) .....	45
Figura 5. Esquema del Procedimiento General de la Prueba LAL .....	55
Figura 6. Interpretación de la prueba de LAL con el método Gel-clot .....	55
Figura 7. Equipos Laboratorio Probiol .....	64
Figura 8. Materiales.....	65
Figura 9. Reactivo LAL y endotoxina.....	65
Figura 10. Ecuación de Búsqueda Estratégica .....	70
Figura 11. Diagrama de flujo de proceso de selección de estudios, según PRISMA .....	74

## Lista de Tablas

Tabla No. 1. Clasificación de la severidad del accidente Bothrópico .....	29
Tabla No. 2. Clasificación de severidad del Accidente Lachésico.....	30
Tabla No. 3. Clasificación de la severidad del accidente Crotálico .....	31
Tabla No. 4. Clasificación de la severidad del accidente Micrúrico .....	32
Tabla No. 5. Recomendaciones de dosificación de los diferentes sueros antiofídicos polivalentes en Colombia: INS, Probiol, Bioclon e Instituto Clodomiro Picado (ICP).....	33
<i>Tabla No. 6.</i> Comparación entre métodos de detección de pirógenos.....	79
Tabla No. 7. Evaluación de calidad de los artículos .....	81

## Lista de Abreviaturas

### Abreviatura Término

BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CID	Coagulación Intravascular Diseminada
CSE	Control Estándar de Endotoxina
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EEB	Agua para Ensayo de Endotoxinas Bacterianas
FDA	Food and Drug Administration
<i>IL-</i>	Interleucina
ICP	Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica)
INS	Instituto Nacional de Salud (Colombia)
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Colombia)
LAL	Lisado de Amebocitos de <i>Limulus</i> ó <i>Limulus</i> <i>Amebocyte Lysate</i>
LPS	Lipopolisacáridos
MAT	Monocyte Activation Test
MDV	Máxima Dilución Válida
Minsalud	Ministerio de Salud (Colombia)

**Abreviatura Término**

---

BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
OMS	Organización Mundial de la Salud
RAM	Reacciones Adversas a Medicamentos
RPT	Rabbit Pyrogen Test o test de pirógeno en conejos
RSE	Reference Standard Endotoxines
SIVIGILA	Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Colombia)
UE ó EU	Unidades de Endotoxinas ó Endotoxin Units
USP	The United States Pharmacopial
WHO	World Health Organization

---

# Introducción

Los accidentes ofídicos constituyen un importante problema de salud pública. Se estima que 5.4 millones de personas al año sufren accidentes ofídicos en el mundo, y cerca de 2.7 millones de las víctimas presentan envenenamiento. **El número de muertes al año se estima entre 81.000 y 138.000 personas. El triple de estos casos culmina con amputación o discapacidad permanente** (Gutierrez et al., 2010). En Colombia, según estadísticas del Instituto Nacional de Salud (SIVIGILA), se reportan 3.500 casos por año, con una mortalidad estimada del 1% anual. Estos eventos son prevenibles y tratables eficazmente con sueros antiofídicos.

El evento se considera de importancia en salud pública a nivel nacional según lo mencionado en la Circular 092 de 2004 del Ministerio de Salud y Protección Social, en el que se resaltó la notificación obligatoria del evento y la generación de reportes relacionados por parte de las entidades territoriales y el Instituto Nacional de Salud. Esta notificación se hizo efectiva y constante a partir de 2007 con la creación del Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) y a partir de 2016, se incorporaron al reporte las mordeduras por serpientes no venenosas (SIVIGILA).

Colombia, está posicionada entre los primeros 5 países del mundo en riqueza de herpetofauna (Gómez et al., 2017). Existen cerca de 300 especies de serpientes de las cuales 50 son venenosas (20 especies de víboras y 30 especies de corales) (Suárez, 2008). Los accidentes ofídicos se presentan con mayor incidencia, en personas entre los 15 y 44 años, afectando principalmente extremidades inferiores. Una de las causas más frecuentes de los casos de ofidiotoxicosis es debido a que, cada vez se comparten más territorios entre el hombre y las serpientes (Gutiérrez et al., 2010).



El suero antiofídico se considera la principal herramienta para proporcionar el tratamiento más eficaz para accidentes por mordedura de serpiente venenosa. Este tipo de medicamento biológico neutraliza el veneno que aún se encuentra circulando en el cuerpo del paciente, minimizando así la fisiopatología específica de cada veneno y evitando los problemas de salud asociados al envenenamiento. Los accidentes pueden ser mayores y peores si el suero antiofídico no se utiliza de manera oportuna y el riesgo aumenta si el tiempo de exposición al veneno es prolongado.

Los sueros antiofídicos son producidos mediante la inyección de una pequeña cantidad de veneno, con la utilización de una adyuvante de origen orgánico o inorgánico, a un animal de experimentación (caballo, oveja, cabra, conejo, entre otros), en dosis repetidas; seleccionando un protocolo de inmunización adecuado para cada veneno (Gómez et al., 2017). Son comercializados para administrar exclusivamente de forma parenteral, preferentemente por vía endovenosa, posterior a la presentación de un accidente ofídico, son la única alternativa efectiva para evitar el deterioro y la muerte del afectado (Gutiérrez, et al 2010). De igual forma, agencias reguladoras a nivel mundial exigen la realización de una prueba de pirogenicidad para medicamentos parenterales, no siendo la excepción para los sueros antiofídicos (Agudelo, 1999).

El análisis de pirógenos constituye uno de los principales ensayos en el control de calidad durante la fabricación de inyectables por su repercusión en la salud humana (Perdomo-Morales, 2004), puesto que la presencia y administración de los mismos, es capaz de provocar una serie de respuestas fisiológicas, en su mayoría de carácter perjudicial y en casos extremos, la muerte del paciente (Perdomo-Morales, 2004). Por las razones anteriores, existe un creciente interés en el conocimiento y dominio de estos métodos. Un pirógeno es un término genérico que se aplica a cualquier sustancia capaz de incrementar la temperatura corporal de un mamífero (Sucup, 2009). Una definición indica que “los pirógenos son sustancias, bacterias Gram Negativas u otros microorganismos que pueden resistir los métodos convencionales de esterilización, presentándose en grandes cantidades después de la muerte y lisis celular. Los pirógenos se pueden encontrar en productos parenterales de uso humano y veterinario, provocando profundos cambios fisiológicos en la elevación de la temperatura” (Sucup, 2009). Por ello, la importancia de su control, al considerarse contaminantes que potencialmente ponen en riesgo la salud humana y animal.

Existe en la literatura una amplia descripción de las pruebas más comúnmente utilizadas y aprobadas para evaluar la pirogenicidad en sueros antiofídicos. Una que tradicionalmente se ha utilizado es la prueba *in vivo* en conejos. Esta es conocida como prueba de oro o “gold standard”. A partir de 1959, con la publicación del libro “Los principios de la técnica experimental humana”, se introdujo en la comunidad científica el

concepto de las 3R (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) y desde entonces se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de alternativas para la prueba de pirógenos en conejos (Caldeira et al., 2018). Con el paso del tiempo, han sido desarrolladas pruebas *in vitro* para evaluación de pirógenos en otros medicamentos parenterales.

El ensayo de evaluación de pirógenos, *in vivo*, con conejos, consiste en medir el aumento de temperatura corporal en el animal, provocado por la inyección intravenosa de una solución estéril de la sustancia a examinar (Real Farmacopea Española, 2008). El seguimiento de la respuesta febril del conejo se ha utilizado como marcador de contaminación de la muestra a pesar de varias deficiencias (Negherbon et al., 2021) como las diferencias en la respuesta de los conejos, debido a la raza, sexo y la variabilidad biológica. Los aspectos anteriores también contribuyen a posibles resultados falsos positivos y falsos negativos (Caldeira, et al., 2018).

Esta prueba se estandarizó y se incorporó a la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) en 1942 y se sigue empleando con regularidad con fines industriales y de investigación, lo que da como resultado un uso animal considerablemente alto. También es una fuente continua de debate sobre el bienestar animal y la relevancia biológica de los resultados (Hartung & Wendel, 1995; Busquet et al., 2020).

La evidente necesidad de desarrollar métodos alternativos para hacer frente a las limitaciones de la prueba de pirógenos *in vivo*, destacando la necesidad de nuevos enfoques, y primando en el concepto de las 3R, en donde la reducción del uso de animales toma aún más importancia, ha hecho que se hayan ido empleando para la evaluación de pirógenos, los llamados métodos *in vitro*, entre los cuales están la prueba de LAL y MAT.

En 1964, Levin y Bang describieron la reacción de coagulación de la hemolinfa del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) después del contacto con endotoxina (Caldeira, et al., 2018). Este fue llamado ***Limulus Amebocyte Lysate test* (LAL)**, y también es conocido como prueba de endotoxina bacteriana (BET por sus siglas en inglés), y se introdujo en la Farmacopea de EE. UU. (USP) en la década de 1980 para

reducir el uso de animales, disminuir la variabilidad y mejorar la sensibilidad y la velocidad de las pruebas de pirógenos. Esta prueba está basada en los mecanismos de reacción de la hemolinfa del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) después del contacto con pirógenos (Hartung et al., 2002).

El mecanismo de esta reacción son los amebocitos que son los principales componentes de la hemolinfa del cangrejo herradura. Los amebocitos cumplen en los invertebrados la función de los glóbulos blancos, defienden al organismo de patógenos, por ello ante las endotoxinas provenientes de las bacterias responden liberando una serie de enzimas (Agudelo, 1999). Los amebocitos contienen enzimas procoagulantes que desencadenan una cascada de reacciones. El producto final de estas reacciones en cadena es un gel compuesto por proteínas coaguladas (Fujifilm, 2015).

LAL se considera un método rápido, fácil y sensible para la detección de endotoxinas. No permite la detección de bacterias y hongos grampositivos, que comprenden la mayoría de los organismos formadores de esporas y representan una característica distintiva de la contaminación pirógena (Caldeira et al., 2018). Utilizar de manera exclusiva la prueba de LAL dejaría de lado posibles episodios de contaminación.

Existen 3 técnicas empleadas para las pruebas de LAL: gelificación (gel-clot), turbidimétrico y cromogénico. El más usado es el método de gelificación o gel-clot, debido a que es empleado por la mayoría de la industria farmacéutica y es el recomendado por la FDA (a menos que se indique lo contrario por el tipo de muestra de estudio) (Fujifilm, 2015).

A finales de la década de 1980 se describió un nuevo método para la detección de pirógenos con el potencial de reemplazar la prueba en conejos. La primera demostración de la aplicación de la prueba de liberación de citoquinas in vitro fue a través de la “prueba de monocitos”, en comparación con los ensayos de conejo y el LAL (Caldeira, et al., 2018). En este método, una línea celular monocítica humana llamada Monomac-6 (MM6) fue sometida a la presencia de endotoxinas de diferentes fuentes y algunas citocinas como la Interleucina 1 Beta (IL-1 $\beta$ ) y el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) demostrando una buena relación dosis-respuesta. Es así, como concretamente, la **prueba de activación de monocitos en sangre completa (MAT**, por sus siglas en

inglés), se basa en la detección de IL-6 o IL-1 $\beta$ , en sangre humana, estimulada *in vitro* por pirógenos (Peterbauer, et al., 1999). Las pruebas basadas en sangre humana también han ofrecido alternativas en las evaluaciones de pirógenos, brindando ventajas potenciales, como lo es la capacidad de detectar pirógenos que no son endotoxinas, no representa ninguna diferencia entre especies y está completamente libre de uso de animales (Caldeira et al., 2016).

Apoyar los procesos de armonización de las técnicas utilizadas para la detección de pirógenos en los sueros antiofídicos sin la necesidad del uso de animales, es una realidad que requiere del compromiso de todos. La presente investigación busca generar conocimiento que permita desarrollar, aprobar e implementar propuestas comunes en las áreas de regulación de las tecnologías sanitarias, teniendo en cuenta los lineamientos y estándares internacionales, orientados a la mejor información disponible sobre las pruebas de detección de pirógenos. Por ello, esta revisión de alcance describe y evalúa críticamente el estado actual del conocimiento sobre la capacidad de las pruebas *in vitro* LAL y MAT, versus el modelo animal, para la evaluación de pirógenos en sueros antiofídicos. Se recopiló información útil para los tomadores de decisiones que lo necesiten y aportar a la reducción del uso de animales.

## Justificación y planteamiento del problema

Los pirógenos representan un serio peligro como contaminantes de productos parenterales. Se encuentran como requisito obligatorio de control por entes regulatorios. Estudios realizados demostraron, que siguen siendo un importante tema a tener en cuenta para la industria, ya que los pacientes expuestos a estos son propensos a complicaciones de salud (Schindler, et al. 2009). Por ello, la importancia de la realización de pruebas de pirogenicidad que permitan su evaluación y control.

La farmacopea de Estados Unidos reconoció en la prueba *in vivo* en conejos la confiabilidad para la determinación de contaminación pirogénica en cualquier producto inyectable y la aprueba en 1942.(Gonzalez & Gutierrez, 1994). Al día de hoy se continua utilizando con regularidad con fines industriales y de investigación, lo que da como resultado índices de uso animal considerablemente altos (Hartung, 2002).

Las pruebas *in vivo* en conejos implican la inyección de veneno de serpiente en los animales para evaluar la efectividad de los sueros antiofídicos. Esto puede causar sufrimiento y estrés innecesario a los animales utilizados en el estudio. Al utilizar pruebas *in vitro*, se evita la necesidad de utilizar animales en experimentación, contribuyendo al bienestar animal y reduciendo su uso en investigación. (Schindler et al., 2003).

Las pruebas *in vitro*, como los ensayos en cultivos celulares o modelos computacionales, han avanzado significativamente en términos de precisión y confiabilidad. Estas alternativas científicas pueden proporcionar resultados comparables a los obtenidos mediante pruebas *in vivo*, sin la necesidad de utilizar animales en los experimentos. (Caldeira, et al., 2018).

El uso de animales en experimentación plantea preocupaciones éticas. Existe un creciente reconocimiento de la importancia de considerar el bienestar y los derechos de los animales en la investigación científica. Utilizar métodos *in vitro* para evaluar sueros

antiofídicos demuestra un compromiso con la reducción del sufrimiento animal y el respeto a los principios éticos. (Busquet et al., 2020).

En Colombia y en muchos países, las regulaciones y leyes relacionadas con el uso de animales en investigación están evolucionando hacia un mayor enfoque en la reducción, refinamiento y reemplazo de los métodos que involucran animales vivos. Al adoptar métodos *in vitro* para evaluar sueros antiofídicos, se cumple con los requisitos legales y regulatorios más actualizados. (Ochiai et al., 2010).

Las pruebas *in vitro* pueden ofrecer una mayor eficiencia y reducir los costos en comparación con las pruebas *in vivo*. Los métodos *in vitro* permiten la automatización, la repetición y la manipulación controlada de los experimentos, lo que puede mejorar la precisión de los resultados y reducir el tiempo y los recursos necesarios para llevar a cabo los estudios.

Con el objeto de reducir la utilización de conejos en el ensayo de pirógenos, el ensayo de Lisado de *Amebocitos* de *Limulus* (LAL), se introdujo en la Farmacopea de Estados Unidos (USP) como prueba de endotoxina bacteriana en 1980, disminuir la variabilidad y mejorar la sensibilidad y la velocidad de las pruebas de pirógenos (Negherbon et al., 2021). LAL es un método que determina con alta sensibilidad la presencia de endotoxinas bacterianas (Perdomo-Morales, 2004)

En resumen, realizar un estudio para disminuir el uso de pruebas *in vivo* en conejos por pruebas *in vitro* para sueros antiofídicos tiene ventajas significativas en términos de bienestar animal, alternativas científicas, aspectos éticos, cumplimiento legal, eficiencia y costo. Estos argumentos respaldan la necesidad de avanzar hacia métodos *in vitro* y reducir la dependencia de las pruebas *in vivo* en este campo de investigación.

Uno de los aportes más importantes de la presente investigación se centra en generar información que contribuya para que los tomadores de decisiones dispongan de información relevante que evidencie todas las características inherentes a cada prueba de pirogenicidad y su uso para evaluar sueros antiofídicos. El impacto permitirá ofrecer información sólida, convirtiéndose en una base importante para futuras investigaciones, pero también una buena herramienta de decisión para los laboratorios productores de

estos sueros. Así mismo, se pretende aportar información para que el uso de las pruebas de pirogenicidad *in vitro* sea considerado como una alternativa válida para sueros antiofídicos, aportando a la reducción de la utilización animal.



# Hipótesis

## Pregunta de investigación

¿Las pruebas *in vitro* (*Limulus Amebocyte* Lysate test (LAL) y Test de Monocitos Activados (MAT)) podrían considerarse como sustitutas de la prueba de pirógenos en conejos para evaluar pirogenicidad en sueros antiofídicos?

## Hipótesis

### Hipótesis nula

Las pruebas *in vitro* (*Limulus Amebocyte* Lysate test (LAL) y Test de Monocitos Activados (MAT)) **No** pueden ser consideradas como sustitutas de la prueba de pirógenos en conejos, para evaluar pirogenicidad en sueros antiofídicos.

### Hipótesis alterna

Las pruebas *in vitro* (*Limulus Amebocyte* Lysate test (LAL) y Test de Monocitos Activados (MAT)) **Si** pueden ser consideradas como sustitutas de la prueba de pirógenos en conejos, para evaluar pirogenicidad en sueros antiofídicos.

## Objetivos

### General

- Describir y evaluar críticamente el estado actual del conocimiento sobre las pruebas *in vitro* (LAL y MAT) versus el modelo animal, para evaluar pirogenicidad en sueros antiofídicos.

### Específicos

- Determinar las principales características de las pruebas *in vitro* LAL, MAT y el test *in vivo* en conejos, y su uso específico para evaluar pirogenicidad en sueros antiofídicos
- Compilar y comparar la evidencia encontrada en la literatura científica, sobre la capacidad de las pruebas *in vitro* (LAL y MAT) versus el modelo animal.
- Realizar un análisis crítico de las pruebas *in vitro* (LAL y MAT) e *in vivo* y generar información sobre el uso de estas técnicas como ensayo alternativo y su utilidad al evaluar la seguridad de los sueros antiofídicos.

## Marco Teórico

### Accidente ofídico

La ofidiotoxicosis es la condición de salud causada por la intoxicación, luego de la inoculación de veneno en casos de mordedura de serpientes venenosas, clasificada como un evento de interés en salud pública, a causa del impacto, gravedad y consecuencias en términos de morbi-mortalidad en la población afectada (Warrell, 2010), razón por la cual estos eventos requieren atención inmediata del personal médico e idealmente en condiciones hospitalarias, ya que se requiere la disposición de los servicios de urgencias de los diferentes organismos de salud, haciendo que sea de vital importancia conocer un diagnóstico y tipo de accidente (idealmente también conocer la especie de serpiente involucrada) para selección de un tratamiento médico preciso y urgente en el paciente. En este contexto, se hace indispensable el uso de sueros antiofídicos que inactivaran las toxinas circulantes en el organismo humano; además del tratamiento de soporte para las manifestaciones tanto locales como sistémicas (Gutiérrez et al., 2010).

Se debe indagar sobre el tipo de actividad que realizaba el paciente en el momento del accidente ofídico, los elementos de protección usados, en caso de estar laborando, el lugar de los hechos, los síntomas posteriores a la mordedura, el tiempo transcurrido entre el accidente y la consulta, las circunstancias del accidente, las características de la serpiente, la parte del cuerpo afectado, los antecedentes de accidentes previos o usos del suero, los tratamientos no médicos y en general todas las variables contenidas en la ficha única de notificación del evento (Walteros & Paredes, 2014).

Este evento es un riesgo ocupacional y ambiental (Williams et al., 2010) presentando un aumento de su incidencia en temporada de lluvias (Chang et al., 2007). Por esto, aquellas poblaciones que habitan principalmente en zonas rurales, son las que más vulnerables a los accidentes ofídicos son, especialmente por tener una orientación laboral enfocada a actividades agrícolas,

muchas veces con dificultades de acceso a los servicios de salud y que por cultura ancestral se promueve el uso de prácticas no médicas o atención prehospitalaria inadecuadas (Gómez et al., 2017).

La mortalidad presentada por el accidente ofídico, es mayor en magnitud que la reportada por otras enfermedades tropicales desatendidas como dengue, malaria, enfermedad de Chagas, entre otros (Williams et al., 2010). Eventos como la rabia y los envenenamientos causados por animales ponzoñosos incluyendo el accidente ofídico, son dos de los tópicos más olvidados respecto a las enfermedades desatendidas en salud pública en el mundo, y a pesar de las consecuencias sanitarias, sociales, y económicas que desencadenan, aún no son gestionadas como un asunto prioritario en las políticas en salud pública de varios de los países afectados por ésta patología (WHO, 2007). Tal vez, la cifra más desoladora en la ofidiotoxicosis, es la relacionada con amputaciones y discapacidades permanentes, encontrándose una realidad bastante cruda, ya que ésta podría llegar a ser el triple de los reportado en las cifras de mortalidad mundial.

## **Clasificación del envenenamiento según el género de la serpiente causante**

### **Envenenamiento Bothrópico**

En el veneno de serpientes pertenecientes a la familia Viperidae, generalmente se encuentran hemorraginas, miotoxinas, proteasas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, kaliceína, metaloproteínas y Fosfolipasa A2. Las cuales favorecerán cuadros hemorrágicos, edematización y de daño tisular severo (Espino-Solis et al., 2009).

Las manifestaciones clínicas del accidente Bothrópico pueden clasificarse en leve, moderado o severo (Walteros & Paredes, 2014) como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla No. 1. Clasificación de la severidad del accidente Bothrópico**

Estado	Aspectos clínicos	Paraclínicos
Estado I (leve)	Dolor local, edema y eritema leves. Buen estado general	Exámenes paraclínicos normales. Pruebas de coagulación normales. Recuento de plaquetas normales.
Estado II (moderado)	Dolor, edema y eritema moderados. Hemorragia local, no hay manifestaciones sistémicas de sangrado. Gingivorragias moderadas.	Pruebas de coagulación prolongada o indefinida. Fibrinógeno disminuido 100-130 mg%
Estado III (grave)	Dolor, edema y eritema graves. Flictenas o ampollas serohemáticas, equimosis, necrosis. Manifestaciones hemorrágicas sistémicas graves: hematemesis, hematuria, melenas. Estado de choque hipovolémico. Mordeduras en cabeza y cuello. Mal estado general.	Pruebas de coagulación indefinidas en tiempo. Fibrinógeno menor de 100mg o consumo total.

Tomado de: Otero-Patino, R. (2009). Epidemiological, Clinical and Therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*, 54, 998 -1011.

## Envenenamiento Lachésico

En Colombia, el accidente ofídico causado por este género representa el 2% y las especies que se encuentran en el país son *Lachesis muta* y *Lachesis acrochorda*. Su veneno presenta mecanismos fisiopatológicos similares al veneno Bothrópico (necrolítico, edematoso, anticoagulante, hemorrágico) y además posee actividad neurotóxica debida a una quinogenasa, que produce activación del sistema nervioso autónomo parasimpático, ocasionando un síndrome de excitación vagal (Walteros & Paredes, 2014).

Por ser un ofidio muy grande (hasta 4 metros un ejemplar adulto) se considera siempre un caso grave (Castrillón-Estrada et al., 2007). En la siguiente tabla, se podrá observar la clasificación de la severidad de este tipo de accidente ofídico:

**Tabla No. 2. Clasificación de severidad del Accidente Lachésico**

Clasificación	Local	Sistémico
Todos los accidentes por <i>Lachesis muta</i> son clasificados como SEVEROS	-Edema de 3 o más segmentos con compromiso del tronco -Mordedura de cara o cuello y necrosis -Ofidio mayor a 1 metro (tamaño del animal agresor) -Pueden presentar adicionalmente síntomas neurológicos como: Fascias miasténicas como ptosis palpebral uni o bilateral, flacidez muscular de la cara, oftalmoplegia, parálisis velopalatina, disfagia, así como síntomas parasimpático-mimética como nauseas, bradicardia y dolor abdominal.	-Compromiso hemodinámico -Complicaciones como CID, injuria renal aguda, sangrado del SNC. Cardiotoxicidad, TP, TTP prolongado

Tomado de: Peña, L.M. (2012). Accidente Ofídico Bothrópico y Lachésico En: Peña, L.M, Zuluaga A.F., editores. Protocolos de manejo del paciente intoxicado. Primera ed. Medellín, Colombia: Editorial Artes y Letras S.A.S. p. 226-33.

## Envenenamiento Crotálico

En Colombia los casos de ofidismo que involucran serpientes de cascabel comprenden el 1% de los casos y son producidos por *Crotalus durissus spp* (Ayerbe, et al., 2008). El veneno de la cascabel sudamericana, posee una acción fundamentalmente neuro-miotóxica, originando cuadros clínicos frecuentemente severos, que están mediados principalmente por la Crototóxina, la cual es un complejo bimolecular formado por una fosfolipasa A2 y por una proteína no tóxica denominada crotapotina (Cavalcante, et al, 2015). El mecanismo tóxico de la Crototóxina está mediado por su habilidad de unirse a la membrana plasmática de la terminal axonal presináptica y a la membrana de las células musculares, provocando la parálisis flácida (Cavalcante & Ponce-Soto, 2015). En la tabla 3, se puede observar la clasificación de la severidad de un accidente crotálico:

**Tabla No. 3. Clasificación de la severidad del accidente Crotálico**

Estado	Aspectos clínicos	Paraclínicos
Estado I (leve)	Dolores leves o moderados en sitio de la mordedura, lipotimia, mareos, visión borrosa, fotofobia. Edema leve en el miembro herido. Orina ligeramente coloreada.	Pruebas de coagulación normales. Fibrinógeno normal. BUN y creatinina normales. Plaquetas normales. Valores séricos de CK. LDH normales.
Estado II (moderado)	Dolor y edema moderados en el miembro herido; parestesias, mialgias generalizadas leves, náusea, vómitos, ptosis palpebral. Alteración de la visión, visión doble (diplopía), visión borrosa, ceguera temporal, parálisis de los globos oculares (oftalmoplejía). Fascies miasténica (neurotóxica de Rosenfield) moderada o evidente. Orina oscura (mioglobulinuria).	Pruebas de coagulación prolongada o indefinida. Fibrinógeno disminuido entre 100 a 140 mg%. BUN y creatinina normales. Plaquetas normales. Plasma coloreado por mioglobina libre. Valores séricos de CK, LDH elevados.
Estado III (grave)	Parálisis flácida generalizada, oftalmoplejía grave, ptosis palpebral grave, ptosis mandibular, fascies inexpresiva (fascies neurotóxica de Rosenfield) por parálisis de los músculos faciales, mialgias graves generalizadas. Dificultad para la deglución, sialorrea, afonía, orina oscura (mioglobulinuria).	Pruebas de coagulación: tiempos indefinidos. Fibrinógeno disminuido entre 40 a 60 mg%, o consumido totalmente. Plaquetas disminuidas, anisopoiquilocitosis. Plasma coloreado por mioglobina libre. Valores séricos de CK, LDH elevados. En insuficiencia renal aguda, elevación del BUN y la creatinina.

Tomado de: Pineda, D., Rengifo J. (2012) Accidentes por animales venenosos: accidente ofídico. Bogotá: Instituto Nacional de Salud.

## Envenenamiento Elapídico o Micrúrico

Corresponden a accidentes relacionados con mordeduras por serpientes del género micrúrico (“corales venenosas”). Corresponde a menos de 0,5 % de los casos en el país. Por los riesgos de insuficiencia respiratoria aguda, estos casos deben ser considerados como potencialmente graves (Walteros & Paredes, 2014). A continuación, se presenta una clasificación por estadios, útiles a nivel clínico de este tipo de envenenamiento:

**Tabla No. 4. Clasificación de la severidad del accidente Micrúrico**

Estado	Aspectos clínicos	Paraclínicos
Estado I (Leve)	Manifestaciones clínicas leves: mareos, adormecimiento en el sitio de la mordedura, dolor leve, náusea, vómito, cefalea. Buen estado general.	Exámenes paraclínicos normales
Estado II (moderado)	Adormecimiento en el sitio de la mordedura, dolor en algunos casos intenso según la especie involucrada y reflejado en todo el miembro herido; náusea y vómito, sensación de cansancio muscular, astenia. Ptosis palpebral leve.	Exámenes paraclínicos normales
Estado III (grave)	Ptosis palpebral, disfonía y afonía, sialorrea, boca entreabierta, fascies neurotóxica de Rosenfeld, parálisis motora flácida generalizada, hiporreflexia osteotendinosa, disnea, sensación de opresión en el cuello y cianosis, en algunos casos muy graves. Relajación de esfínteres, micción involuntaria.	Exámenes paraclínicos normales

Tomado de: Instituto Nacional de Salud. (2017). Vigilancia y análisis del riesgo en salud pública, protocolo de vigilancia en salud pública: accidente ofídico. Versión 3. En: [http://observatoriosaludcauca.gov.co/wp-content/uploads/2019/11/PRO-Accidente-ofidico\\_.pdf](http://observatoriosaludcauca.gov.co/wp-content/uploads/2019/11/PRO-Accidente-ofidico_.pdf)

## Envenenamiento por Colubridos

Las manifestaciones clínicas más comúnmente observadas en los accidentes humanos por colubridos opistoglifodontes son edema, eritema, linfangitis superficial con adenitis regional dolorosa del miembro herido. Algunos pacientes presentan adenomegalias regionales. Sensación de adormecimiento y parestesias en el sitio de la mordedura (INS, 2017).

## Dosificación de antivenenos en accidentes ofídicos

El tratamiento y dosificación de suero antiofídico (Número de ampollitas a suministrar al paciente con ofidiotoxicosis) será según la clasificación de la severidad del envenenamiento ocurrido y del laboratorio productor, así como se muestra en la siguiente tabla:



**Tabla No. 5. Recomendaciones de dosificación de los diferentes sueros antiofídicos polivalentes en Colombia: INS, Probiol, Bioclon e Instituto Clodomiro Picado (ICP)**

Tipo de envenenamiento	Cuadro clínico	Laboratorio productor **			
		Número de ampollas			
		INS	Probiol	Bioclon	ICP
Botrópico	Leve	2	4	4	4
	Moderado	4	8	8	8
	Grave	6	12	12	12
Crotálico	Moderado	12	12	12	No recomendado
	Grave	20	20	20	
Lachésico		***	12	12	12
Dosis adicionales de antiveneno (si se requiere)		2	4	4	4

Tomado de: Walteros D., Paredes A., León L. J. (2015). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública, Accidente ofídico. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Salud, Grupo de Enfermedades Transmisibles Equipo de Zoonosis; p. 1-28.

\*\*\*Revisar el inserto

\*\* La vía de administración de todos estos antivenenos es la intravenosa. La dosis calculada se debe diluir en solución salina normal 250 ml para adultos, 100 ml para niños y administrar en una hora, iniciando con un goteo lento para verificar aparición de reacciones adversas, si éstas ocurren debe suspenderse temporalmente la administración del antiveneno, tratar la reacción y continuar con el suero antiofídico a una velocidad de infusión menor hasta administrarlo en su totalidad. El suero antiofídico polivalente del ICP no tiene efecto neutralizador para envenenamientos por serpiente coral o serpiente cascabel suramericana vigentes, el riesgo de reacciones adversas al suero y su manejo es similar al de otros sueros antiofídicos (Walteros & Paredes, 2014).

## Sueros antiofídicos

Calmette produjo el primer *serum antivenimeux* a finales del siglo ante pasado; sin embargo, previamente otros científicos como Sewall (1887), Roux y Yersin (1888), Behring y Kitasato (1890) hicieron sus aportes para la generación de antisueros debido a los estudios realizados por ellos sobre la difteria y el tétano que dieron lugar al inicio de la terapia con antisueros frente a estas dos enfermedades (Gutiérrez et al., 1988). Posteriormente, vinieron los trabajos de Phisalix y Bertrands (1894) que demostraron la actividad antitóxica de la sangre de animales

inmunizados contra *Vipera aspis* (víbora europea), de manera simultánea Calmette (1894) trabajó con el veneno de la cobra vietnamita en Saigón; posteriormente, el Instituto Pasteur de París estudió la eficiencia de tres diferentes protocolos de inmunización para la obtención de antisueros (Gómez et al., 2017).

Calmette fue el primero en preparar un antiveneno comercial para uso médico contra las mordeduras de la cobra de la India, convirtiéndose así en el verdadero promotor de la terapia antiveneno (Chippaux & Goyffon, 1998). Luego muchos otros investigadores en diferentes países empezaron a desarrollar antivenenos (McFarland en Estados Unidos-1899, Tidwell en Australia-1902, Ishizaka en Japón -1907) a través de los protocolos establecidos previamente por Calmette (Gutiérrez, et al, 1988). Para Latinoamérica fue vital Brasil con el Instituto Butantan, considerado el precursor de la terapia antiveneno en dicho país (Ferreira et al., 2003). En Costa Rica, en la década de los 20, el Dr. Clodomiro Picado fue quien realizó los primeros estudios, pero solo hasta 1967 se produjo el primer lote para uso humano (Gutiérrez et al., 1988).

El suero antiofídico es un biológico que se crea mediante la inyección de una pequeña cantidad de veneno inoculado en un animal (caballo, oveja, conejo, entre otros) (Chippaux & Goyffon, 1998). Éste desarrolla una respuesta inmune contra el veneno, produciendo anticuerpos contra la molécula activa del veneno; estos tratamientos se usan para cualquier tipo de animal ponzoñoso (Otero, 1994).

La inmunización de los modelos animales, sugerida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), propone que éstos deben pasar por un período de cuarentena entre 3 a 6 semanas antes de suministrar el veneno, evaluación veterinaria estricta, desparasitación del animal y tamizaje de enfermedades específicas para la especie escogida; una vez pasan este proceso, se puede iniciar la inmunización (Triana, 2017). El animal preferido para este procedimiento es el equino a causa del gran volumen de sangre disponible, por prosperar en todos los climas y también porque los métodos de purificación de anticuerpo de caballo están bien estandarizados (Ferreira et al., 2003). La inoculación del veneno crudo proporciona el más alto título, sin embargo, el veneno total es mal tolerado por los animales; normalmente se inactiva el veneno con el uso de un aldehído y formulado con un adyuvante, el cual ayuda a regular la velocidad de liberación del veneno y por lo tanto estimula aún más la respuesta inmunológica (Espino-Solis et al., 2009). El adyuvante más utilizado es el complejo de Freund, que permite la mayor respuesta inmune, una liberación lenta de los venenos y menor actividad tóxica en los animales (Waghmare et al., 2014).

El protocolo de inmunización depende de la toxicidad, la inmunogenicidad del veneno, el modelo animal usado para la inmunización, la calidad de la respuesta inmunitaria y de la respuesta sistémica del animal, por lo que para obtener un buen título de anticuerpos se requiere de un período de 3 a 15 meses, necesario para obtener hiperinmunización (Espino-Solis et al., 2009). Cuando se alcanza un título de anticuerpos adecuado, la sangre del animal se recoge con un anticoagulante adecuado (por ejemplo, citrato de sodio) para luego ser sometido a purificación (Gómez et al., 2017). Los eritrocitos son devueltos al equino, evitándose así un estado anémico al animal.

Una vez obtenido el suero crudo, este debe ser almacenado entre 2-8°C bajo condiciones estériles y sanitarias apropiadas, adicionándole preservativos para prevenir la contaminación bacteriana y la desnaturalización de las proteínas plasmáticas (Padilla et al., 2010).

En la actualidad, se utilizan dos métodos de purificación de anticuerpos por precipitación diferencial de proteínas plasmáticas no inmunoglobulínicas, mediante el agregado de ácidos grasos de cadena corta como el Ácido caprílico o con sulfato de amonio. Es decir, lograr la eliminación de albúmina, globulinas no inmunes y otras proteínas del suero, quedando así, como agente terapéutico la molécula de inmunoglobulina G (IgG) concentrada (Litwin et al., 2014). Este proceso se realiza a partir de plasmas equinos hiperinmunes para la producción de antivenenos a nivel industrial, obteniéndose preparaciones enriquecidas en moléculas de inmunoglobulinas G (Rojas et al., 1994). Adicionalmente, se usa la digestión enzimática con pepsina o papaína que se incluye en varios protocolos con el fin de obtener fracciones divalentes o monovalentes de inmunoglobulina, es decir, fragmentos  $F(ab')_2$  y Fab (Guidolin et al., 2010). Es importante resaltar que la composición del antiveneno, según si contiene Inmunoglobulina G completa o fracciones de Inmunoglobulina G; Fab (unión monomérico) o  $F(ab')_2$  (unión dimérica) (Gutiérrez et al., 2011) (en la figura 1 se muestra la estructura de la IgG y sus fracciones), tendrá implicaciones clínicas en la cantidad de ampollas requeridas para lograr el mismo efecto de neutralización. Pues los procesos de purificación, fraccionamiento y modificación de la forma farmacéutica de los antivenenos, pueden favorecer la desnaturalización proteica (Gutiérrez et al., 2011).

Estos procesos se realizan con el propósito de disminuir el riesgo de sufrir eventos adversos asociados al uso del antiveneno tales como: reacciones de hipersensibilidad inmediata

(anafilaxia) e hipersensibilidad tardía (enfermedad del suero), debido a la alta concentración de proteínas heterólogas (Vargas et al., 2015).

**Figura 1. Estructura de la Inmunoglobulina G indicando sus fracciones**



Tomado de: Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. (2009). Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. *Journal of proteomics*. 72(2):183-99.

El antiveneno es monoespecífico si sólo se usa un veneno de una especie de serpiente o poliespecífico si el animal recibe una mezcla de venenos de varias especies (Espino-Solis et al., 2009). La posibilidad de elegir cuál o qué tipo de antiveneno hacer, depende de una serie de consideraciones como: especies presentes a nivel territorial, si hay o no reactividad cruzada entre un grupo monadal o poliespecífico (Otero-Patiño, 2009); esto a su vez tendrá implicaciones directas de tipo económico-comercial y de capacidad de neutralización económica, ya que se puede impactar una mayor zona geográfica (local o regional) con un mismo antiveneno. También es importante tener en cuenta factores epidemiológicos, cantidad de veneno producido y de su consecución, el perfil toxicológico de los venenos, y por supuesto, la eficacia y la seguridad de los antivenenos (Gutiérrez et al., 2010).

Los antivenenos tienen reactividad cruzada dentro del grupo del cual taxonómicamente descienden, por ejemplo, los antibotrópicos protegen contra los venenos de las serpientes patocos (*Porthidium nasutum* y *P. lasbergui*), las víboras de tierra fría (*Bothriechis schelegellii*), las rabo de chucha (*Bothrops punctatus*) y las habituales mapanás (*Bothrops asper* y *B. atrox*), entre otras (Campbell & Lamar, 2004). Los anticuerpos producidos neutralizan todos estos venenos, a pesar de que son fabricados solo con veneno de *Bothrops asper* (además de *Lachesis* y *Crotalus*) (Gómez et al., 2017).

Estos biológicos neutralizan bien las especies antes descritas tanto en su capacidad letal, hemorrágica, formación de edema, capacidad desfibrinante y miotóxica, aunque con diferencias entre las diferentes casas productoras (Otero et al., 1997). También hay que decir que la capacidad de neutralización disminuye en la medida que se aumenta la exposición a diferentes antígenos, es así como entre mayor número de especies se intente abarcar con el antiveneno, menor será su efectividad (Ferreira et al., 2003).

## Reacciones Adversas

Ahora, al hablar de antivenenos y su calidad, se debe hablar de las reacciones adversas al medicamento (RAM). Para ello, hay que mencionar que estos biológicos son moléculas extrañas al organismo humano (son proteínas de caballo) que pueden provocar reacciones adversas al cuerpo humano, por lo tanto, son de estricta vigilancia médica (Gómez et al., 2017). Las reacciones pueden ser tempranas (primeras 24 horas) en las cuales se presenta pápulas urticariformes, mialgias, escalofríos, edema angioneurótico, hipotensión y broncoespasmo (Lomonte, 2012), o pueden ser tardías (5-24 días después del tratamiento). La llamada “enfermedad del suero” se caracteriza por: fiebre, urticaria, dolores articulares, proteinuria, linfadenopatías y neuropatías (Lomonte, 2012). A su vez las reacciones adversas al suero pueden ser de dos tipos, anafilácticas y anafilactoides. La anafilaxis es causada por un mecanismo inmunológico que incluye un anticuerpo IgE, que se fija a la célula cebada o al basófilo y reacciona con algunos alérgenos (para este caso los sueros), esto causa la liberación de múltiples moléculas endógenas mediadoras de la reacción anafiláctica (Gómez et al., 2017). Las reacciones anafilactoides tienen síntomas similares a los de la anafilaxia, pero son desencadenadas por mecanismos no mediados por IgE (activación del complemento) que ocasionan la liberación directa de los mediadores (Caron et al., 2009). Las reacciones anafilácticas se presentan en menos del 5% de los casos, mientras que las anafilactoides se presentan en el 25% de todos los casos (Otero et al., 1997).

Ahora cabe la pregunta: ¿de qué depende que se presenten o no reacciones adversas al suero antiofídico, ya sean tempranas o tardías? La respuesta es multifactorial y puede estar asociada a los siguientes factores: a) la dosis de antiveneno, ya que las respuestas observadas parecen ser proporcionales a la cantidad de suero administrado; b) concentración de proteínas; c) tipo de inmunoglobulina; d) tasa de infusión; e) grado de atopía de cada individuo (en pocas palabras,

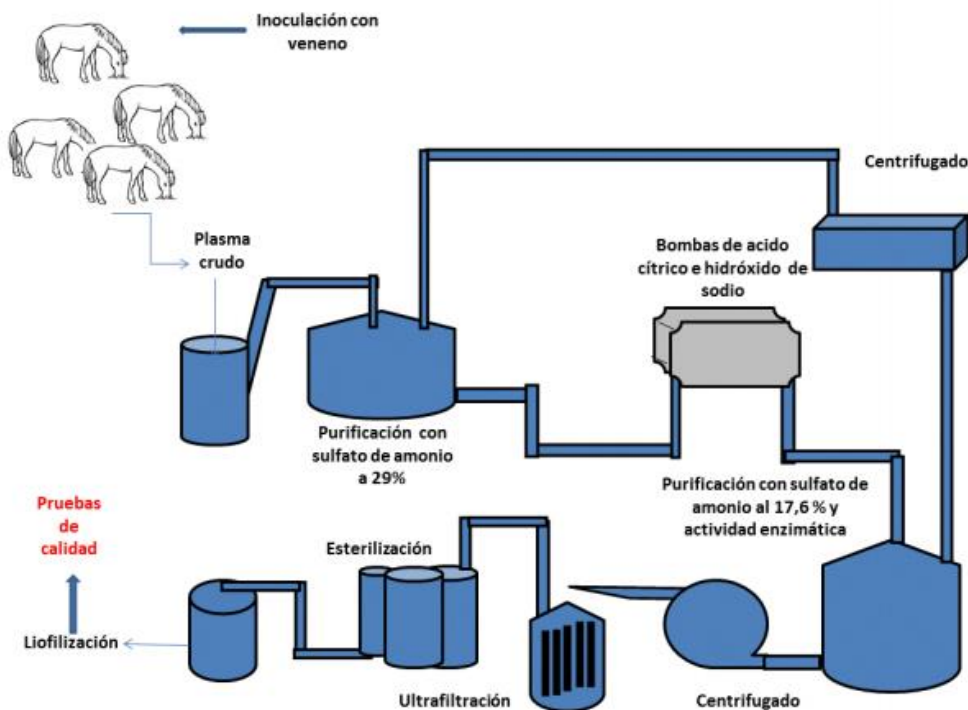
el tipo de respuesta inmunológica que genera cada persona) (Caron et al., 2009). También influyen los siguientes factores: f) la sensibilización a la proteína de suero de caballo, ya sea por el uso previo de algún tipo de suero heterólogo, o contacto anterior con productos equinos, y claro está; g) la vía y el tiempo de administración (al parecer cuando se administra el suero en bolo por vía intravenosa puede influir en la velocidad de aparición de la reacción) (Caron et al., 2009). También hay que mencionar que hay evidencia de que h) las reacciones adversas varían según el tipo de envenenamiento sufrido; por ejemplo, se sabe que los venenos de *Crotalus* y su posterior administración de sueros anticrotálicos (especialmente en niños), pueden generar las reacciones adversas con mayor frecuencia y de mayor gravedad en comparación con los antivenenos antibotrópicos (Gómez et al., 2017). Por último, y tal vez uno de los más importantes factores que inciden en la aparición de las reacciones adversas es “el tipo de antiveneno”; las reacciones son más frecuentes cuando se utilizan sueros de baja purificación, por lo tanto, una de las labores fundamentales es aumentar el grado de purificación, eliminando al máximo todas las moléculas diferentes a anticuerpos dirigidos contra el veneno, que son los directos responsables de su neutralización (Ferreira et al., 2003).

El conocimiento de los efectos indeseados de los antisueros, fueron extraídos de la evidencia proporcionada por los primeros sueros utilizados eran simples, sin ningún proceso de purificación, estos inducían una gran cantidad de reacciones adversas por la gran cantidad de componentes que el suero tiene, a estos se les denominó sueros de primera generación (Gómez et al., 2017). Posteriormente, se fueron refinando los procesos de purificación por una serie de pasos sucesivos con el fin de reducir las reacciones anafilácticas y anafilactoides que normalmente desencadenaban (Gómez et al., 2017). Después de la eliminación de los elementos celulares por centrifugación, las proteínas no inmunes y especialmente la albúmina, se descartan por precipitación con sulfato de amonio o de ácido caprílico, sin afectación de la inmunoglobulina; a estos sueros se les denomina de segunda generación y son los más utilizados en el mundo, incluyendo Colombia (los sueros tanto del INS como de Probiol pertenecen a este tipo) (Gómez et al., 2017). Para los años 80, se empieza aplicar por parte de algunas compañías la técnica de digerir las inmunoglobulinas utilizando la pepsina para producir fragmentos  $F(ab')_2$ ; la idea en teoría es quitar la fracción “FC”, la cual es responsable de modular la gran mayoría de las reacciones adversas (Chippaux & Goyffon, 1998).

## Proceso de fabricación de antivenenos

Los antígenos son suministrados a los caballos en una preparación del veneno disuelto en solución salina. En el esquema básico de inmunización, en una primera y segunda dosis, la solución de veneno es acompañada del adyuvante de Freund (completo o incompleto), recibiendo refuerzos (Gómez et al., 2017). El intervalo entre las inoculaciones varía de 7-21 días (dependiendo del esquema) con cantidades de veneno 2-5 mg por 10 ml por animal y reinmunizando a los 30 días después de la última sangría (Ferreira et al., 2003). Entre los 7-10 días de la última dosis de antígeno, un pequeño volumen de sangre es retirado de cada animal para la titulación de anticuerpos, los que presenten títulos adecuados son seleccionados y el resto descartados para ese lote; los animales son sangrados por tres días consecutivos para obtener un volumen total de 15-18 litros por animal, la sangre colectada con anticoagulante se lleva a la separación del plasma donde luego les son refundidas las plaquetas en un proceso llamado 'plasmaféresis' (Pino, 1994). El suero recolectado pasará al proceso de purificación con sulfato de amonio (caso de los antivenenos en Colombia), fraccionamiento enzimático o termocoagulación en otros casos (Gómez et al., 2017). Este componente modifica la solubilidad de las inmunoglobulinas, separándolas de la albumina y de otros componentes (Figura 2). El sulfato es removido por diálisis y el suero será purificado, concentrado y esterilizado a temperaturas de 2-8 grados, mientras se le hace el test de control (Figura 2) (Gómez et al., 2017). Luego el suero será diluido, se le agrega preservante (fenol o m-cresol), es isotonzado, ajustado en pH 6 a 7 y sometido otra vez a filtración esterilizante; posteriormente, se le realizarán todas las pruebas de calidad exigidas por la ley (pruebas microbiológicas, biológicas, físico-químicas, pruebas *in vitro* e *in vivo*); por último, se hará liofilización (dependiendo de la casa productora, y es el caso de los sueros producidos por Probiol y Bioclon, que se consiguen en Colombia) y envasado (Abd-Elsalam et al., 2011); cada lote es vigilado en su calidad por el ente rector, que para Colombia es el INVIMA, el cual dará el aval para su liberación y venta. La Organización Mundial de la Salud (OMS) incorporó éstos antivenenos en su listado de medicamentos esenciales en 2007. En Colombia, el Consejo Nacional de Seguridad Social en Salud (CNSSS), incluyó en el Acuerdo No. 228 de 2002, modificado por el Acuerdo No. 008 de 2009, expedido por la Comisión de Regulación en Salud (CRES), los productos suero antiofídico monovalente (Bothrops) y suero antiofídico polivalente en el Plan Obligatorio de Salud (POS), considerado como medicamento esencial (Zambrano, 2012).

**Figura 2. Esquema general de producción de sueros antiofídicos en Colombia**



Tomado de: Ferreira Cardoso, D., Yamaguchi, I. K., & Maura Da Silva, A. M. (2003). Produção de Soros Antitoxinas e Perspectivas de Modernização por técnicas de biologia molecular Animais peçonhentos no Brasil: biología, clínica e terapéutica dos accidentes (p. 371).

## Control de calidad en sueros antiofídicos

El control de calidad no es una etapa separada durante la fabricación del antiveneno. Por el contrario, es y así está requerido por múltiples normativas, una parte integral en todo el proceso de producción. Comienza con el monitoreo de: 1) cuartos limpios, 2) la producción de agua para inyección, 3) la higienización/esterilización de la línea de equipos, y 4) la calidad de las materias primas. Sin embargo, también incluye la evaluación de los pools de veneno de referencia, desde el mismo monitoreo de las serpientes de las que se tomará el veneno que será inoculado a los equinos (León et al., 2018).

Como se mencionó anteriormente, el control de calidad de los venenos incluye la determinación de actividades tóxicas y enzimáticas (Camey et al., 2002), la capacidad del veneno para estimar la potencia del antiveneno (Fukuda et al., 2006); (Araujo et al., 2008), y la verificación de que



estas actividades se conservan durante el almacenamiento a largo plazo (Jesupret et al., 2014). Se evalúa la seguridad y eficacia del proceso de inmunización por la evaluación clínica de animales hiperinmunes utilizados como fuente de inmunoglobulina (Angulo et al., 1997) y por el ensayo de potencia, respectivamente. Por lo general, el ensayo de potencia se realiza mezclando grandes dosis de veneno y diluciones variables de antiveneno, para lograr diferentes proporciones veneno/antídoto. Después de un período de incubación, alícuotas de las mezclas se inyectan en animales y el número de muertes es registrado y utilizado para calcular una expresión matemática de la antipotencia del veneno (Araujo et al., 2008). El ensayo de potencia también se utiliza para determinar la eficacia preclínica de antivenenos en procesos finales.

La calidad del proceso de sangrado en los equinos, está determinada por los profesionales veterinarios, (Angulo et al., 1997) y el estado microbiológico junto al perfil del plasma hiperinmune. El contenido máximo de endotoxinas permitido en el plasma debe calcularse como el producto de la endotoxina límite para el antídoto final y la potencia del último producto, dividido por la potencia del plasma crudo (Pino, 1994).

La calidad inmunológica de los antídotos en proceso/finales normalmente es limitado a la evaluación de la capacidad del antiveneno para neutralizar la letalidad de los venenos homólogos, como se explicó anteriormente (Gutiérrez et al., 2017). Sin embargo, se puede obtener información adicional de la evaluación de la capacidad del antiveneno para neutralizar otros tóxicos y efectos inducidos por los venenos, tales como hemorragia, desfibrinogénación, miotoxicidad, necrosis, edema y bloqueo neuromuscular (Gutiérrez et al., 2013). La calidad microbiológica de los antivenenos en proceso/finales se determina evaluados por la prueba de esterilidad (USP, 2014a) y la prueba de pirógenos, que evalúa el aumento de la temperatura rectal de conejos inyectados en la vena marginal de la oreja con una dosis de antiveneno, en un período de 3 h (USP, 2014b).

Alternativamente, para reducir el uso de animales, la prueba de pirógenos puede sustituirse por el ensayo de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) (Solano et al., 2015). En este caso, el límite de endotoxinas para el antídoto final puede ser calculado como la relación K/M, donde K es la dosis pirogénica umbral de endotoxina por kilogramo de peso corporal (es decir, 5 UE/kg), y M es la dosis total máxima de antiveneno administrada a un paciente de 70 kg por 1 h (USP, 2014c; Solano, et al., 2015).

La calidad fisicoquímica de los antivenenos en proceso/finales incluye la determinación de pH, proteína total (Gornall et al., 1948), concentración del conservante, concentración de cloruro (USP, 2014d), turbidez (Segura et al., 2009), patrón electroforético, presencia de agregados (García et al., 2002), humedad residual (Herrera et al., 2014), y ácido caprílico residual (Herrera et al., 2009) y otras sustancias utilizadas durante el fraccionamiento, como el sulfato de amonio. Por lo tanto, para cumplir con estas normas, se concluye que el producto debe someterse a pruebas biológicas para determinar la potencia (neutralización), la esterilidad (ausencia de bacterias y hongos), la presencia de pirógenos, la inocuidad y la seguridad (Gutiérrez et al., 2011). También se elaboran pruebas químicas, para medir la concentración de proteínas y de albúmina, el contenido de sales o fenol y el pH. Además, se realizan pruebas físicas, que analizan la presencia de partículas y turbidez, así como el color del producto (Madigan et al., 1999).

Inmunoglobulinas neutralizantes o fragmentos de inmunoglobulinas (es decir, IgG, F(ab')<sub>2</sub> o Fab) son el principio activo de los antivenenos. Entonces, pequeñas cantidades de proteínas no inmunoglobulínicas (es decir, albúmina, fibrinógeno, transferrina y ceruloplasmina) y altas cantidades de inmunoglobulinas no neutralizantes son los contaminantes proteicos más importantes en antivenenos actuales (Segura et al., 2013).

Teóricamente, todos los lotes de antiveneno producidos por el mismo proceso maestro deben tener las mismas características microbiológicas, fisicoquímicas, y calidad inmunológica. Luego, el análisis de muchos lotes de sueros antiofídicos es requerido para evaluar la calidad del proceso maestro. Se requiere la estandarización del proceso maestro para garantizar que todos los lotes de antiveneno cumplen con las especificaciones que no se pueden probar en cada lote, como la estabilidad (León et al., 2018).

En última instancia, la presentación del producto final varía de acuerdo con el método y las especificaciones del fabricante. La adición de preservantes químicos a los anti venenos es ampliamente utilizada, siendo los más comunes el fenol, el timerosal y el cresol (León et al., 2018). Así mismo, el producto puede presentarse en forma líquida o liofilizada. La forma líquida debe ser almacenada a 4 °C., tiene la capacidad de estar lista para usarse de inmediato y posee un período de caducidad de 3 años. Por su parte, el liofilizado no debe mantenerse en refrigeración, se disuelve antes de usar en agua estéril y tiene una vida media de 5 años (Madigan et al., 1999).

## Pirógenos

Un pirógeno es un término genérico que se aplica precisamente a cualquier sustancia capaz de incrementar la temperatura corporal de un mamífero. Con respecto a lo anterior se puede definir que “los pirógenos son sustancias, microorganismos o bacterias Gram Negativas que pueden resistir los métodos convencionales de esterilización, presentándose en grandes cantidades después de la muerte y lisis celular. Por lo general los pirógenos se encuentran en productos parenterales de uso humano y veterinario, provocando profundos cambios fisiológicos en la elevación de la temperatura” (Sucup, 2009).

### Tipos de pirógenos

Se conocen en la actualidad dos tipos de pirógenos:

#### Pirógenos exógenos

Se conocen como sustancias externas al cuerpo; es decir, que son ajenos al huésped. Pueden tratarse de microorganismos y se considera improbable que tengan la capacidad de actuar directamente sobre el centro regulador de la temperatura hipotalámico, induciendo la producción del pirógeno endógeno (Lifshitz, 2007).

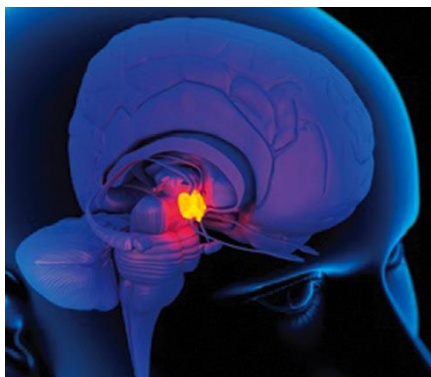
#### Pirógenos endógenos

Son producidos por el huésped y se conocen como citoquinas, que inducen fiebre. Éstas son capaces de introducir cambios al hipotálamo, identificándose como la interleucina-1 (IL-1). Demostrándose que con ciertas cantidades de IL-1 producirían fiebre en el hombre y animales (Lifshitz, 2007). En síntesis, los pirógenos endógenos son sustancias proteínicas liberadas por los leucocitos después del contacto con una endotoxina bacteriana (Lifshitz, 2007).

La temperatura del cuerpo es controlada por el hipotálamo y sus mecanismos reguladores mantienen la del núcleo corporal a un nivel normal, ajustando tanto la producción como la pérdida del calor. Durante la fiebre, el hipotálamo ajusta esos procesos para mantener la temperatura del núcleo corporal en un valor nuevo y más alto, llamado ‘valor de referencia’, un valor que es establecido por medio de la frecuencia de generación de potenciales de acción en las neuronas termoreguladoras del hipotálamo (Boulant, 2000). El hipotálamo es nuestro termostato biológico y recibe e integra señales homeostáticas para mantener la temperatura dentro de un pequeño

intervalo. En la Figura 4 se puede apreciar su ubicación en el ser humano. En términos mecanísticos, la fiebre es una elevación del valor de referencia de la temperatura corporal en respuesta a citocinas pirógenas que actúan sobre el hipotálamo a través de receptores que estimulan cambios en ese valor (Ramón-Romero & Farias, 2014).

**Figura 3. Localización del hipotálamo en la cabeza del ser humano**



Tomado de: Fidel Ramón-Romero y José María Farías. La fiebre. Rev. Fac. Med. (Méx.) vol.57 no.4 Ciudad de México jul./ago. 2014.

Aunque aparentemente los patógenos externos son la razón última de la fiebre, en realidad son los pirógenos internos o endógenos los que producen directamente el aumento en el 'valor de referencia' termorregulador. Esto es, porque el organismo mantiene un 'valor de referencia' en el hipotálamo (Figura 3) y que en respuesta a algún agente activo (bacterias vivas, bacterias muertas con pared celular, endotoxinas, virus) los leucocitos del anfitrión y tal vez otro tipo de células fagocíticas, liberan al líquido extracelular una proteína que actúa como 'pirógeno interno'. Estos pirógenos internos afectan los sensores de temperatura en el hipotálamo, llevando a una elevación en ese 'valor de referencia' (Ramón-Romero & Farias, 2014).

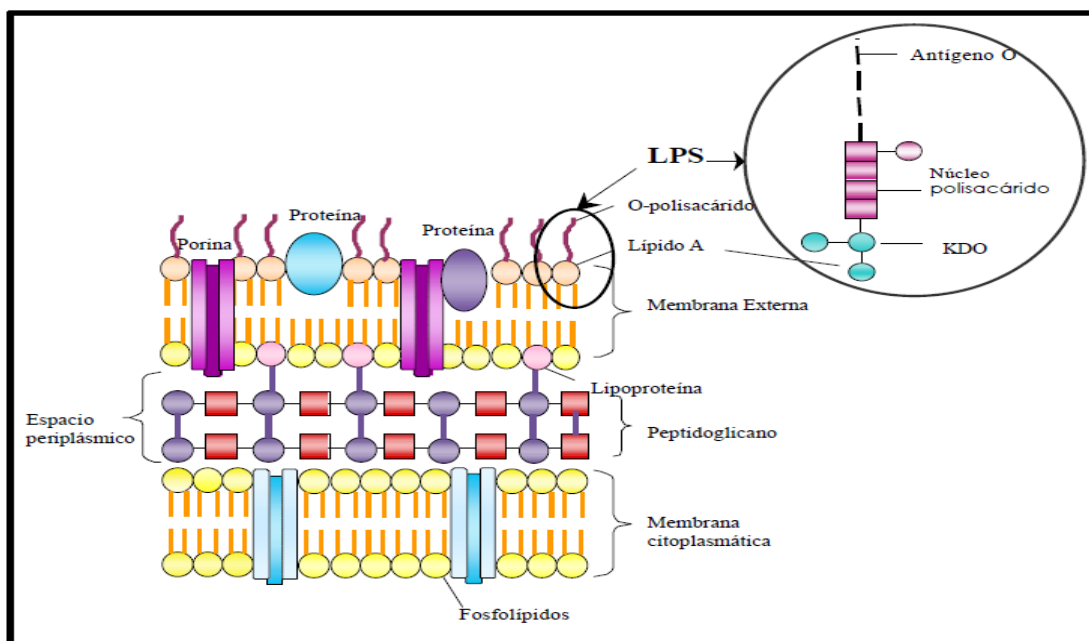
Cabe resaltar la importancia de los pirógenos en el control de calidad de los productos, ya que varias décadas de experiencia y de investigación, demuestran que los pirógenos se presentan solo en soluciones parenterales y en dispositivos médicos, derivados de la membrana externa de bacterias Gram Negativas (Sucup, 2009).

## **Endotoxinas**

Las endotoxinas tienen un peso molecular aproximado de 200.000 a 1000.000 Daltons (Agudelo, 1999). Su estructura característica tiene tres distintas regiones, las cuales se pueden ver en la Figura 4 (Agudelo, 1999):

1. **Lípido A:** unidad diglucosamina que contiene ácidos grasos con una longitud de la cadena de 10 a 20 átomos de carbono.
2. **Oligosacárido:** conocido como core, el cual contiene heptosas inusuales y un azúcar unido, conocido como el 3-deoxi-Doctuloso (KDO).
3. **Antígeno O:** un oligosacárido repetido del disacárido del lípido A, son hidrofílicos de la terminación del Lípido A.

**Figura 4. Estructura de una endotoxina (muestra las 3 regiones Antígeno O, Oligosacárido, KDO)**



Tomado de: Agudelo, C. M. (1999). Trabajo de grado. Valoración de endotoxinas bacterianas en suero antiofídico de origen equino. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Hoy en día la calidad, inocuidad, y seguridad de los productos farmacéuticos es de relevante importancia debido a su amplia formulación en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades. En el ambiente de los laboratorios, el personal, los implementos de trabajo, así como las materias primas y el agua, albergan microorganismos, que se desarrollan y afectan la calidad de los medicamentos. Para ello se realizan las pruebas de pirogenicidad, como la prueba

de Lisado de Amebocito de Limulus (LAL) que son de importancia debido a que evalúan la calidad del producto, en la determinación de bacterias Gram Negativas o endotoxinas (Carrillo et al., 2006).

Un contaminante propio de origen bacteriano en los medicamentos son las endotoxinas, que se conocen como complejos lipopolisacáridos-proteína, siendo el responsable de la mayoría de los efectos biológicos atribuibles a las endotoxinas. De acuerdo con lo anterior se puede decir que las endotoxinas son componentes derivados de las capas externas de las paredes celulares de las bacterias Gram Negativas que se liberan al medio tras la lisis bacteriana o en la reproducción de la bacteria en algunos casos (Iriarte et al., 2001).

Los principales efectos de los lipopolisacáridos (LPS) o endotoxinas son (Caro & Cruz, 2006):

- Termoestables
- Resistente a la esterilización con autoclave
- Su actividad endotóxica se asocia al componente lipídico, liberado cuando la célula se lisa y como consecuencia de la fagocitosis o acción de los antibióticos.
- El cuadro clínico depende de la cantidad de endotoxina circulante y puede ser desde una reacción febril hasta falla multiorgánica, pudiendo llegar a la muerte.

Las endotoxinas actúan también como pirógenos, por tanto, causan fiebre cuando se acumula la suficiente cantidad de bacterias Gram Negativas en los tejidos, como para hacer contacto con la circulación; la reacción febril se produce porque las endotoxinas inducen la liberación de ciertas proteínas conocidas como pirógenos endógenos (Caro & Cruz, 2006). También se caracterizan por su potente actividad biológica, ya que son capaces de producir profundos cambios fisiológicos. Un ejemplo es la coagulación de la sangre, presente en tres formas (Fernández-Aceytuno & Rodríguez, 1995). Por esto, Fernández y Rodríguez (1995) mencionan la importancia de la actividad biológica de las endotoxinas en la coagulación de la sangre, las cuales son:

- Activa el factor XII o el factor de Hageman (activando la vía intrínseca de la coagulación)
- Provoca la liberación de gránulos de las plaquetas, que están involucrados en la coagulación.
- Provoca la liberación de proteínas básicas de los neutrófilos, que estabilizan los coágulos de fibrina.

## Fiebre

Se conoce como la elevación de la temperatura corporal por encima del margen normal. La temperatura promedio del ser humano es de 37°C; por lo general la fiebre actúa como respuesta adaptativa, ayuda al cuerpo a combatir los organismos que causan enfermedades y surge en respuesta a unas sustancias llamadas pirógenos que se derivan de bacterias o virus que invaden el cuerpo (Lifshitz, 2007):

Autores como Holvey y Talbot (1974) enuncian 6 tipos de fiebre:

- **Hipertérmica:** consiste en la elevación de la temperatura corporal de 37°C hasta llegar a los 40.6°C.
- **Mantenida:** se conoce como la temperatura constante por encima de lo normal.
- **Intermitente:** la temperatura baja hasta lo normal o por debajo cada día y luego vuelve a subir.
- **Remitente:** se conoce como la elevación y descensos diarios de la temperatura, sin retorno a lo normal.
- **Héctica (séptica):** oscilaciones marcadas de la temperatura, muchas veces con escalofríos y sudoración.
- **Recurrente:** son episodios febriles que alteran con uno o más días de temperatura normal.

## Termorregulación biológica

Un centro termorregulador en el hipotálamo controla la temperatura del cuerpo al alterarse la circulación de la piel, la sudación y la actividad muscular. La fiebre es asociada a infección de origen bacteriana y se debe por acciones de un pirógeno endógeno que a su vez actúa directamente sobre el centro termorregulador (Holvey & Talbot, 1974).

Algunos eventos fisiológicos dependen de la temperatura y la actividad enzimática que es efectora de muchas funciones del organismo que se desarrolla a una temperatura óptima, por encima o por debajo de la cual las reacciones bioquímicas son menos eficientes. Por debajo de la temperatura óptima, la cinética molecular no es suficiente para propiciar un número crítico de interacciones entre enzima y sustrato. Por arriba de ella, las enzimas y al cabo las proteínas, comienzan su desnaturalización por el calor (Lifshitz, 2007).

## **Mecanismo de acción de los pirógenos para producir la fiebre**

Es de gran importancia la interleucina-1 ya que experimentos con animales han demostrado que algunos pirógenos pueden actuar de manera directa e inmediata sobre el centro hipotalámico regulador de la temperatura cuando se inyectan dentro del hipotálamo e incrementa el punto de ajuste (Lifshitz, 2007). Otros actúan de manera indirecta y necesitan varias horas para causar efectos. Es frecuente con muchos pirógenos de origen bacterianos en particular con las endotoxinas bacterianas (Gram Negativas) cuando los tejidos o la sangre contienen bacterias o productos de degradación de las bacterias; los leucocitos de la sangre, los macrófagos de los tejidos y los grandes linfocitos granulados citolíticos los fagocitan. A su vez todas estas células digieren los productos bacterianos y liberan luego la sustancia interleucina-1, que se conoce también como pirógeno leucocitario o pirógeno endógeno, a los líquidos corporales (Guyton & Hall, 2001).

Cuando la interleucina-1 alcanza el hipotálamo, activa de inmediato los procesos que producen fiebre y, en ocasiones aumenta la temperatura corporal en cantidad notable, después de 8 a 10 minutos. Basta una diezmillonésima parte de un gramo de la endotoxina lipopolisacárida de las bacterias que actúa en concierto con los leucocitos de la sangre, los macrófagos de los tejidos y los linfocitos citolíticos para ocasionar fiebre (Guyton & Hall, 2001).

Según los diversos eventos y experimentos, la interleucina-1 produce fiebre porque:

- Induce la síntesis de una prostaglandina, en particular la prostaglandina  $E_2$  o una sustancia análoga y esta a su vez actúa en el hipotálamo para producir una reacción febril.
- Cuando se bloquea la información de la prostaglandina con fármacos la fiebre desaparece por completo o al menos disminuye y esta puede ser una explicación de cómo funciona la aspirina (Ácido Acetil Acético) ya que es una sustancia que impide la formación de las prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (Guyton & Hall, 2001).



## **Reactivo *Limulus Amebocyte Lysate polyphemus* (LAL)**

El *Limulus Amebocyte Lysate polyphemus* (LAL) es un reactivo de origen biológico, que es obtenido de la sangre del cangrejo herradura y fue descubierto en 1956 por el doctor Frederick Bang. El cangrejo *Limulus polyphemus* es uno de los animales que más años ha sobrevivido en la tierra, sus orígenes datan, según diversos autores a más de 200 millones de años (Perdomo-Morales, 2004). Este animal tan resistente experimenta coagulación en su hemolinfa por causa de la presencia de endotoxinas bacterianas. Al descubrirse este hecho en la década de los 60, se continuaron las investigaciones hasta lograr aprovechar esta reacción para realizar ensayos *in vitro* de detección de endotoxinas en diferentes medios (Dawson, 2005). El *Limulus polyphemus* pertenece al grupo de los cangrejos herradura, también se le conoce como cangrejo bayoneta o cangrejo cacerola. Este cangrejo habita en la costa atlántica de la parte norte del continente americano, incluyendo el golfo de México (Fujifilm, 2015).

Los responsables de la coagulación de la hemolinfa de los cangrejos *Limulus polyphemus* son los amebocitos, principales componentes de la hemolinfa de este animal. Los amebocitos cumplen en los invertebrados la función de los glóbulos blancos en los vertebrados, defienden al organismo de patógenos, por ello ante las endotoxinas provenientes de las bacterias responden liberando una serie de enzimas. Los científicos estudiaron este fenómeno hasta comprobar que, si se diluye un lisado de los amebocitos extraídos del cangrejo herradura en un medio acuoso, pueden servir para detectar cantidades muy pequeñas de endotoxinas (Fujifilm, 2015). Los amebocitos contienen enzimas procoagulantes que desencadenan una cascada de reacciones. El producto final de estas reacciones en cadena es un gel compuesto por proteínas coaguladas. Como se ha mencionado en las líneas anteriores, entonces esta prueba se basa en la formación de un coágulo a través de una cascada de activación enzimática donde la proteína coagulógeno, es desdoblada por la enzima de coagulación activada, los productos de desdoblamiento son insolubles y se unen mediante la interacción iónica para formar una matriz de gel. Éste es considerado como una alternativa en el control de endotoxinas bacterianas, en productos parentales de uso humano y veterinario (Carrillo et al., 2006) (Sanchez-Corredor, 1994). Este ensayo también se usa en otras industrias, como la cosmética y alimentos. Es uno de los métodos aconsejados por la FDA y la USP para la detección de pirógenos.

Cabe agregar que el fundamento bioquímico está basado por una serie de etapas de activación enzimática, en donde 4 sustancias son necesarias para la obtención de la reacción de

gelificación, la enzima más importante es la coagulante que está en 3 de sus procesos. Por otro lado, se tiene en cuenta proteínas coagulables o coagulógeno, y cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  que se encuentran dentro del lisado. Y por último la endotoxina presente en las muestras, son las encargadas de realizar la reacción (Sanchez-Corredor, 1994).

El ensayo LAL solo es válido para detectar endotoxinas y no cualquier otro tipo de pirógeno. En muchas ocasiones se utiliza este ensayo con el objetivo de detectar otros pirógenos, lo cual es un error. Si bien las endotoxinas bacterianas son de los pirógenos que más prevalecen después de las medidas de sanitización comunes en las industrias, por ser muy resistentes al calor y a los diferentes reactivos químicos usados para esterilización, un ensayo LAL negativo solo indica la ausencia de endotoxinas, no la de otros microorganismos pirógenos. La realización de este ensayo solo conduce a la confirmación de medio libre de pirógenos cuando está acompañado de otros análisis y medidas sanitarias específicas para erradicar el resto de microorganismos contaminantes (Fujifilm, 2015).

Para el uso del ensayo de LAL se debe realizar una validación para el proceso industrial específico en el que se va a aplicar. La FDA regula las validaciones de este ensayo, encontrándose muchos registros en la literatura de este procedimiento, sobre todo para fármacos inyectables (Fujifilm, 2015).

## **Validación**

El concepto de validación ha sido descrito de diversas maneras según la literatura, pero los autores llegan a una conclusión de conceptos generales con un mismo significado como: especificar e implementar, aprobar y documentar. En síntesis, validar es verificar documentalmente que un método o proceso hace lo que tiene que hacer.

La definición de validación suministrada por las Buenas Prácticas De Manufactura (BPM) especifica el concepto como: “la obtención de pruebas con arreglo a las normas de correcta fabricación de cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema que produce en realidad el resultado previsto” (Solis, 2004).

La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto, trabajar con métodos que ofrecen confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez

minimiza el número de errores y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costos. La definición analítica de validación es “el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos” (Caro & Cruz, 2006; Solis, 2004).

Para la validación analítica de la prueba del LAL, es necesario mostrar un enfoque con las pruebas documentadas, demostrando que el método analítico es lo suficientemente confiable, para producir un resultado previsto dentro de los intervalos definidos, de modo que se tienen en cuenta conceptos básicos que son referentes en el proceso de validación, los cuales son: (Caro & Cruz, 2006)

- **Exactitud:** se conoce proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero.
- **Precisión:** grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales, cuando se aplica el método repetitivamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea.
- **Límite de detección:** es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, no necesariamente es cuantificable en las condiciones experimentales indicadas.
- **Límite de cuantificación:** es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas.

En el caso de la validación de la prueba de LAL, se toman en cuenta estándares de endotoxinas que son reguladas exclusivamente para el método de LAL por la FDA (Guideline On Validation Of The *Limulus Amebocyte Lissado Polyphemus* Test) quienes definieron que era necesaria la preparación de éstas debido a las controversias generadas por los resultados con el reactivo, para la adecuación de la estandarización del ensayo de LAL, toman como referencia la *E. Coli* (endotoxinas estándar de referencia RSE) debido a que el potencial de RSE es conocido, utilizándose como estándar para la calibración de la potencia del control CSE (control de endotoxinas estándar) o como patrón secundario la potencia de la RSE y las unidades de las endotoxinas se conocen como (UE) por vial (Carrillo et al., 2006).

Al momento de validar la prueba de LAL, es necesario determinar la sensibilidad, permitiendo que la endotoxina indicada en la etiqueta, sea detectada por el reactivo. También se recomienda calificar en el manejo de éste método al operario que va a comenzar a realizar las pruebas de LAL, y lograr así mayor confiabilidad en los resultados, confirmando la sensibilidad etiquetada de cada nuevo lote de reactivo LAL (Caro & Cruz, 2006).

También se debe conocer el certificado de análisis de control del lote de endotoxinas estándar CES de trabajo y el lote del reactivo LAL que está siendo utilizado; con el fin de realizar la validación de la sensibilidad del rótulo en donde este procedimiento se debe realizar cada vez que se trabaja con un lote nuevo del reactivo LAL, para verificar que no haya variación en la sensibilidad del rótulo del reactivo (Sanchez-Corredor, 1994).

### **Límite de endotoxina**

El límite de endotoxinas está referenciado por la FDA. En el caso del suero antiofídico, se encuentra calculado, encontrándose bajo el nombre de Antivenom y su límite es de **1.67 EU/ml**.

### **Máxima dilución válida (MDV)**

Otro aspecto que es importante conocer se denomina como máxima dilución válida (MDV). Consta básicamente en conocer la mayor dilución que se le puede hacer a un producto y determinar el límite de endotoxinas presentes, con el método de LAL (Perdomo-Morales, 2004). Algunos productos son validados por diferentes diluciones inferiores a la (MDV): los cálculos para hallar la MDV, tienen como referencia al límite de endotoxinas permitidos por la USP (The United States Pharmacopeal conventions) del producto a evaluar y se revisa la presentación del producto, así como la referencia de la sensibilidad de LAL. La MDV es calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{MDV} = \frac{\text{LÍMITE DE ENDOTOXINA UE/ml}}{\text{SENSIBILIDAD DEL LAL}}$$

**(MDV)** = Máxima dilución válida.

**(UE/ml)** = Sensibilidad de LAL por mililitro.

Para llegar a la validación del producto, se tiene en cuenta la concentración del producto a ensayar. Para que no haya interferencia significativa con la prueba es importante que en los ensayos que se vayan a realizar, se preparen las diluciones del producto con y sin endotoxinas agregadas. Al ser el producto diluido puede eliminar interferencias y detectar concentraciones críticas de endotoxinas (Sanchez-Corredor, 1994).

## Métodos de las pruebas de LAL

Los métodos empleados para las pruebas de LAL son tres: el más importante se conoce como el método de gelificación o gel-clot, debido a que es empleado por la mayoría de la industria farmacéutica y es el recomendado por la FDA (a menos que se indique lo contrario por el tipo de muestra de estudio); turbidimétrico y cromogénico (Dawson, 2005). Estos serán explicados a continuación:

### Gelificación o gel-clot

El método de Gel-Clot de la prueba de LAL, es el método más clásico, debido a su fácil interpretación, ya que la reacción, es básicamente desarrollada en el tubo de ensayo de manera *in vitro* debido a fundamentos bioquímicos de la hemolinfa de la sangre del cangrejo de herradura frente a las endotoxinas, de modo que el ensayo es menos susceptible a la inhibición, en donde, al momento de realizar las pruebas se requiere un equipamiento más sencillo y menos costoso (Fujifilm, 2015). Cabe resaltar que cada fabricante del reactivo LAL describe su propia metodología siendo pequeña la diferencia entre los protocolos.

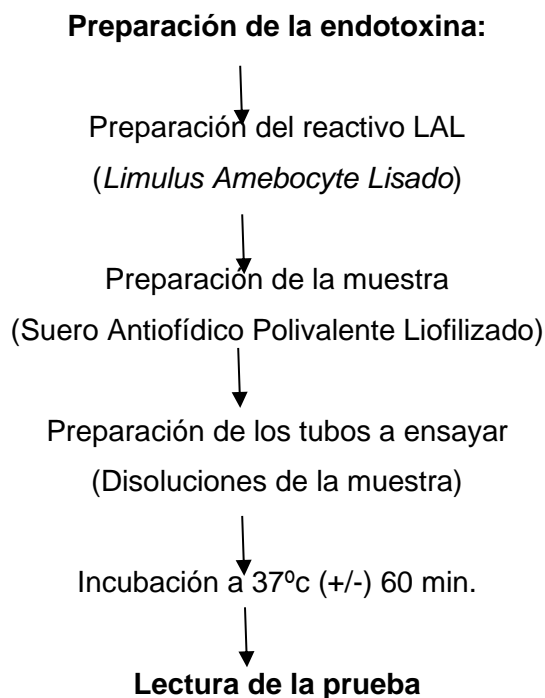
El límite de detección de los ensayos depende del fabricante del kit que contiene el reactivo de LAL, normalmente usando el método de Gel-Clot el límite de detección está entre 0.01 y 0.03 unidades de endotoxinas por mililitro (UE/ml) de disolución usada en el ensayo. Esto significa que por debajo de esta concentración de endotoxinas no se llega a formar un gel sólido, que permanezca en el tubo de ensayo al mover el mismo. El alcance del método es limitado por la sensibilidad del lisado. Con este método no se podrá cuantificar endotoxinas por debajo del nivel (Carrillo et al., 2006).

Un criterio usado en el método de gelificación es girar el tubo de ensayo hasta cubrir un ángulo de 180° con el giro y comprobar que el gel se mantiene intacto. El método Gel-Clot puede usarse de manera cualitativa, dando resultados positivo o negativo si no se llega a formar el gel, y

semicuantitativa, ya que la cantidad de gel que se forma es proporcional a la concentración de endotoxinas (Fujifilm, 2015).

A continuación, en la figura 5, se esquematiza el procedimiento general de la prueba de LAL mediante el método Gel-clot para sueros antiofídicos:

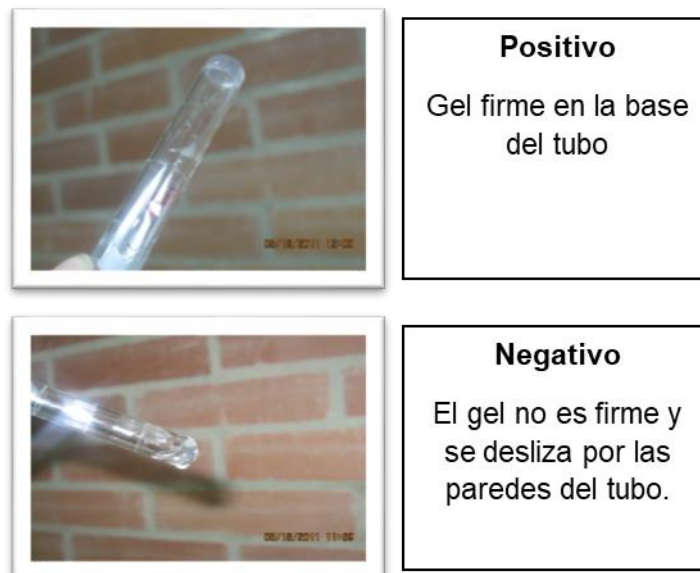
**Figura 5. Esquema del Procedimiento General de la Prueba LAL**



Fuente: Elaboración Propia

Interpretación de la prueba de LAL con el método Gel-clot

Invertir los tubos de ensayo 180° (observar formación del gel)

**Figura 6. Interpretación de la prueba de LAL con el método Gel-clot**

Fuente: Laboratorio Probiol S.A

El **control negativo** debe dar siempre negativo, si da lo contrario puede ser, que el material este mal despirogenizado, el tiempo y la temperatura no fueron adecuados, o el reactivo está contaminado (Probiol, 2015). Por otro lado, cada proveedor del reactivo LAL, maneja un protocolo para la realización de las pruebas, que en general, no deben tener una variación significativa. La metodología empleada para los protocolos de la sensibilidad de la etiqueta, protocolo de inhibición y el de las pruebas rutinarias están estipulados por la USP bajo algunas modificaciones de la casa matriz del reactivo (Dawson, 2005).

Como se expondrá detalladamente más adelante, es importante tener en cuenta para esta prueba, que uno de los principales interferentes de este ensayo son los  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) - D -glucanos, que también son capaces de activar la cascada de reacciones que conduce a la formación del gel, mediante vía de activación del Factor G (Morita et al., 1981). En el mercado existen diversos kits donde se extrae el Factor G del lisado de amebocitos para evitar esta interferencia. Otra posibilidad que existe para eliminar la activación por parte de  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) -D-glucanos, es inhibir la acción del factor G (Fujifilm, 2015). Es importante mencionar, que todo el ensayo de LAL, se debe realizar siempre, de forma tal que se evite la contaminación por endotoxinas.

### Turbidimétrico

Este tipo de reactivo contiene suficiente coagulógeno que va a formar una solución turbia, pero no un coágulo firme, cuando es dividido en subunidades de la enzima protocoagulante y el punto final se determina por la lectura del espectrofotómetro a una longitud de onda de 360 nm y el punto final está basado en la relación cuantitativa entre la concentración de endotoxinas y la turbidez (absorbancia y transmitancia) de la mezcla de reacción al final de la incubación (Sanchez-Corredor, 1994).

### Cromogénico

El coagulogéno se reemplaza totalmente o parcialmente, por un sustrato cromogénico el cual es un péptido sintético pequeño unido covalentemente a un cromóforo (p-nitroanillada) la intensidad del color formado (amarillo que absorbe una longitud de onda de 405 nm) es proporcional a la endotoxina y se determina por la interpretación en una curva patrón. Por último, el punto final está basado en la realización cuantitativa entre la concentración de endotoxinas y la liberación de cromóforos al final de la incubación (Perdomo-Morales, 2004).

## **Factores de inhibición en la prueba de LAL**

Hay factores que son comunes y que son reconocidos como la disminución en la sensibilidad del reactivo del LAL. Por lo general siempre se recomienda que todo el producto sea ensayado para verificar la ausencia de inhibición (Solis, 2004).

### $\beta$ 1,3–Glucanos

Los  $\beta$ -Glucanos consisten de polisacáridos no ramificados de  $\beta$ -D-Glucosa como la celulosa, pero con un enlace  $1\beta$ -3 por cada tres o cuatro enlaces  $1\beta$ -4. Los  $\beta$ -Glucanos son de alto peso molecular y se conocen como polisacáridos de monómeros (cadena de  $\beta$ - (1-3)-D-Glucosa) ligados con enlaces glucosídicos que forman moléculas largas y cilíndricas que pueden contener hasta 250,000 unidades de glucosa (Morita et al., 1981). Éstos se encuentran en las paredes de las células del endospermo de granos como la cebada y la avena, también son útiles en la nutrición humana, por su notable capacidad para modular la acción del sistema inmunitario teniendo como principal acción, la capacidad de unirse y estimular receptores de los macrófagos encontrados en los nódulos linfáticos de la pared intestinal y ayudan a reducir las enfermedades del corazón bajando el nivel de colesterol y reduciendo la reacción glicémica de los carbohidratos.



Se usan comercialmente para sustituir grasas y para modificar la textura de los productos alimenticios (Yu-Lai et al., 2005).

Los  $\beta$ -Glucanos, son sustancias que también se pueden encontrar en productos parenterales, algunos casos son empleados en procesos de filtración, debido a que se utilizan fibras de celulosa que están presentes en el papel y que a su vez se comportan como glucanos (Yu-Lai et al., 2005). Un ejemplo de un producto parenteral que realiza proceso de filtración, es el Suero Antiofídico Polivalente Liofilizado que durante su proceso de producción se utilizan filtros de este tipo, con el fin de realizar la esterilización del producto. Pequeñas partículas de estos filtros pueden estar presente en éste, interfiriendo con el reactivo de LAL generando falsos positivos. Es decir, a pesar de éste patrón no generan cambios fisiológicos en la elevación de la temperatura en el paciente (Hartung, 2002).

## **Falsos positivos**

Resultados que se obtienen por la presencia de sustancias que activan el LAL, que son diferentes a las endotoxinas, sugiriendo que están presentes, pero no es así. Por lo tanto, se debe conocer la naturaleza del producto y el proceso de fabricación. Se cree que la presencia de la tripsina y de los glicanos son los causantes principales de estos resultados (Caro & Cruz, 2006).

## **Potenciación**

Se conoce como el incremento en la sensibilidad del reactivo del LAL detectando más endotoxinas en la muestra; es fácil confundir una potenciación con la presencia de endotoxinas en la muestra (Dawson, 2005). Una forma de determinar la potenciación es colocando una cantidad conocida de CSE (Control estándar de endotoxina) a una muestra libre de endotoxinas y determinar con el ensayo de LAL la cantidad de endotoxinas presentes. Si la cuantificación de éstas resulta mayor que la cantidad conocida adicionada se habla de potenciación (Carrillo et al., 2006).

## **Inhibición**

Es la situación que suele ser más común, según diversos autores consultados. Se reconocen por una disminución en la sensibilidad de LAL. Todo producto debe ser ensayado previamente para verificar la ausencia de inhibición ya que se pueden presentar como falsos negativos. La

estandarización del ensayo para el producto demuestra que la detección de las endotoxinas no será afectada significativamente por el producto (Sanchez-Corredor, 1994).

## Monocyte Activation Test (MAT)

El procedimiento fue introducido en 1995 (Hartung & Wendel, 1995). En su momento, los autores diluyeron sangre entera humana heparinizada y recién extraída de un donante sano, en solución salina de grado clínico fisiológico, libre de pirógenos, se juntó con la muestra de prueba. En respuesta a los pirógenos, los monocitos contenidos en la sangre, producían citoquinas proinflamatorias de forma dependiente de la dosis (Schindler et al., 2003).

La prueba MAT se puede utilizar para detectar citocinas liberadas por monocitos humanos activados o células monocíticas, como la interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), que tienen papeles importantes en la patogenia de la fiebre. En la actualidad, con el uso de crio preservados, como el llamado human WB, mediante la introducción de un procedimiento de congelación estandarizado, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotector, el MAT se volvió más estandarizado y más ampliamente disponible, y se demostró que puede ser utilizado como una herramienta para estudiar los detalles de la vía de reacción de la fiebre en la respuesta inmunitaria humana innata (Schindler et al., 2003).

De los beneficios más reconocidos del test de MAT, es la detección, tanto de endotoxinas, como de pirógenos no endotóxicos, en productos parenterales, como productos farmacéuticos y dispositivos médicos. Otra gran ventaja, es que brinda una alternativa *in vitro* a las pruebas convencionales en animales (Caldeira, 2018).

La prueba Rabbit Pyrogen Test (RPT-conejos) y la prueba *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) usan animales y muestran algunas limitaciones. La prueba de pirógenos en conejo muestra una falta de robustez ya que una reacción animal puede diferir mucho de una reacción humana. En la prueba LAL, solo se detectan endotoxinas, que causan un riesgo de seguridad al ignorar los pirógenos no endotóxicos, que podrían estar presentes en la muestra analizada (Caldeira et al., 2016; De Agostini et al., 2018). Para superar estas limitaciones, la Prueba de Activación de Monocitos (MAT) se introdujo en la Farmacopea Europea en 2010 como un método complementario para reemplazar la Prueba de Pirógenos en Conejos (Farmacopea Europea,

Capítulo 2.6.30) y se menciona en la guía de la FDA para la industria (Schindler et al., 2003). La Comisión de la Farmacopea Europea tomó la decisión de poner fin a la prueba de pirógenos en conejos de acuerdo con el principio de las 3R considerando que la MAT es la mejor opción alternativa. La literatura menciona que MAT es un ensayo *in vitro* que imita la reacción inmune humana: para un modelo predictivo robusto que reduce el consumo animal (Caldeira et al., 2016).

Como se ha mencionado, la literatura pone como mayor ventaja en esta prueba, si se compara con la prueba de LAL, la detección de una amplia gama de pirógenos, garantizando así la seguridad del paciente, al analizar una gama completa de pirógenos. Este ensayo se puede utilizar para detectar organismos Gram-positivos y Gram-negativos y pirógenos parasitarios, virales y otros biológicos (por ejemplo, levadura). Al igual que la prueba de pirógenos en conejos (RPT), MAT es eficaz para la detección de pirógenos de endotoxinas y no endotoxinas. Así mismo, esta prueba permite una ampliación en la gama de productos que se pueden analizar. Ya que la prueba en conejos y la prueba de LAL, están limitados en los tipos de productos que pueden analizar (Schindler et al., 2009). Sin embargo, la introducción y aplicación generalizadas de MAT encuentra restricciones normativas y prácticas relacionadas principalmente con el uso de sangre humana fresca o monocitos y la flebotomía asociada (Caldeira et al., 2016).

El kit comercial de MAT se basa en la línea celular Mono-Mac-6 (MM6) y utiliza la interleucina-6 (IL-6) como modo de lectura. Una vez que los monocitos humanos entran en contacto con los pirógenos de una muestra contaminada, producen citocinas como la interleucina-6 (IL-6), que puede detectarse con un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). Los kits comercialmente disponibles, tienen un límite de detección de 0.05 UE/ml (Schindler, et al., 2009).

El sistema PyroDetect, que es una presentación comercial de la prueba MAT, consta de tres pasos principales: la incubación de sangre criogénica (o sangre fresca), el ELISA de IL-1 $\beta$  y el análisis (De Agostini et al., 2018). A continuación, se podrá encontrar mayor información al respecto:

### **Incubación de sangre criogénica**

El test MAT, utiliza sangre criogénica (sangre entera humana congelada) para la incubación de la sangre. La sangre fresca, con un límite de tiempo de hasta 4 horas después de la donación, también se puede utilizar. Las muestras son mezcladas con la sangre en la placa de cultivo

celular y se mantiene en una incubadora durante la noche a 37°C. Si los pirógenos están presentes en la muestra, los monocitos de la sangre producirán IL-1 $\beta$  durante la incubación (Caldeira et al., 2016).

## **Interleuquina 1 $\beta$ y ELISA**

Para la detección de la IL-1 $\beta$  la mezcla de la incubación con sangre criopreservada, se transfiere a una microplaca ELISA, recubierta con un anticuerpo específico para IL-1 $\beta$ . Las moléculas de interleuquina presentes en el sobrenadante del cultivo se unen al anticuerpo inmovilizado. Entonces un anticuerpo policlonal ligado a enzimas específico para IL-1 $\beta$  es agregado. Con la adición del sustrato se produce una reacción de color, lo que permite la detección del límite IL-1 $\beta$  en un lector ELISA (De Agostini et al., 2018).

### **Análisis**

La concentración de pirógenos en la muestra, es entonces determinado a partir de la concentración de IL-1 $\beta$ , por medio de una curva estándar de endotoxina, y, según el kit que MAT que se esté usando, se podrá contar con herramientas para análisis de datos, propios de éstos (Caldeira et al., 2016).

## **Prueba de pirógenos en conejos por la USP (United States Pharmacopeia) Oficial 01 mayo 2011**

La prueba de pirógenos en conejos, establece si se produce o no pirogénesis tras la administración intravenosa de una solución parenteral. Este ensayo está diseñado para evaluar productos que pueden ser tolerados por conejos, en una dosis que no exceda los 10ml. Se deben seguir las indicaciones adicionales establecidas en la monografía individual o, en el caso de antibióticos, o productos biológicos, seguir las indicaciones adicionales en las reglamentaciones federales de los estados unidos (USP 34, 2011).

### **Aparatos y diluyentes**

Despirogenizar jeringas y material de vidrio por calentamiento a 250°C durante no menos de 30 minutos o utilizando otro método adecuado. Todos los diluyentes o soluciones para el lavado y enjuague de los dispositivos o sistema de inyección parenteral, se debe tratar de manera que

garanticen la esterilidad y la ausencia de pirógenos. Se debe realizar periódicamente representativas de los diluyentes y soluciones que se emplean para el lavado y enjuague de los aparatos cuando se especifique que el uso de la inyección contenga 0.9% de NaCl (USP 34, 2011).

## **Registro de la temperatura**

Emplear dispositivos sensoriales de la temperatura exactos, tales como termómetros clínicos, sondas termométricas, u otra clase de sonda calibrada, que aseguren una exactitud de  $0.1 \pm ^\circ\text{C}$  y faciliten la lectura máxima en menos de 5 minutos. Insertar la sonda sensora de temperatura en el recto del conejo con una profundidad no menos de 7.5 cm y durante un periodo no menor que el previamente estimado como suficiente. Registrar la temperatura corporal del animal de prueba (USP 34, 2011).

## **Animales de prueba**

Emplear conejos adultos, y sanos, ya que la dosis umbral de pirógenos para producir reacción febril es la misma en estos animales y para humanos. Se mantienen individualmente en un lugar sin perturbaciones que los puedan excitar y evaluarlos para que mantengan una temperatura uniforme entre 20 y 23°C con una variación máxima de 3°C respecto a la temperatura seleccionada. Antes de emplear por primera vez un conejo en una prueba de pirógenos se debe acondicionar durante un periodo no menor a 3 días, pero no mayor a 7 días, realizando un ensayo simulado que incluya todos los pasos en el procedimiento, omitiendo la inyección (USP 34, 2011).

Los conejos deben cumplir las siguientes especificaciones:

- ✓ Albinos nueva Zelanda
- ✓ Conejos adultos y sanos entre 2.5kg y 3kg, que hayan mantenido su peso con una dieta libre de antibióticos durante la semana anterior a la ejecución de la prueba
- ✓ Machos, ya que las hembras pueden presentar problemas en la interpretación, debido a las características intrínsecas de su sexo
- ✓ Buena alimentación

- ✓ Mantenerlos individualmente en un lugar sin perturbaciones que los puedan excitar y a temperatura uniforme entre 20° y 23°, con variación máxima de 3° respecto de la temperatura seleccionada

Después de usar los conejos para una prueba de pirógenos, se deben descartar para futuras pruebas, ya que no podrán ser utilizados para reanalizar el producto suero antiofídico liofilizado (USP 34, 2011).

## Procedimiento

El ensayo debe llevar una aérea determinada exclusivamente para la prueba de pirógenos con condiciones ambientales similares a las del espacio donde están alojados los conejos, libres de perturbaciones que puedan excitarlos. Durante el periodo de prueba se suspenderá el alimento mientras que el acceso al agua sí está permitido en todo momento, pero podrá restringirse durante la prueba. Si el dispositivo empleado para medir la temperatura rectal debe dejarse insertado durante el periodo de prueba, sujetar los conejos mediante los sujetadores de cuello, no muy ajustado y que les permita adoptar una postura natural de descanso. 30 minutos antes de la inyección de la dosis de prueba se deberá determinar la “Temperatura control” en cada conejo: esta temperatura será la base para determinar si hay aumento provocado por la inyección en una solución de prueba, emplear solamente aquellos cuya temperatura control no varíe más de 1°C respecto a las demás y descartar los conejos cuya temperatura corporal exceda de 39.8 °C (USP 34, 2011).

A menos que se especifique algo diferente, se inyectará a cada uno de los 3 conejos, en la vena marginal de la oreja, 10ml de la solución de prueba por kg de peso, completándose cada inyección dentro de los 10 minutos desde el inicio de su administración. La solución de prueba es o bien el producto reconstituido de acuerdo con las especificaciones de la etiqueta, o bien el material de análisis, tratado según indica en la monografía individual. Para la inyección lavar o enjuagar las superficies del dispositivo del sistema que entra en contacto con el material administrado en forma parenteral, con el sitio de inyección o con los tejidos internos del paciente. Asegurarse siempre que todas las soluciones de prueba estén protegidas de la contaminación. Administrar la inyección después de tibar la solución de prueba a una temperatura de  $37 \pm 2$  °C y registrar la temperatura a intervalos de 30 minutos durante un periodo de 1 a 3 horas posteriores de la inyección (USP 34, 2011).

Durante la ejecución de la prueba siempre es importante tener en cuenta que cualquier tipo de perturbación (por ejemplo: hablar, tratar rudamente a los conejos, entre otras) podrá excitar a los animales, y aumentarán las posibilidades de que se presenten falsos positivos durante el ensayo.

## **Interpretación y continuación de la prueba**

Considerar cualquier disminución de la temperatura como elevación cero. El producto cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de pirógenos si ningún conejo muestra un aumento de 0.5°C o más, por encima de su temperatura control respectiva. Si algún conejo muestra un aumento de más de 0.5 °C, se deberá continuar la prueba empleando otros 5 conejos. El material de análisis cumplirá los requisitos para determinar la ausencia de pirógenos cuando no más de 8 conejos tienen aumento máximo de la temperatura individuales que no exceda 3.3°C (USP 34, 2011).

## **Otras consideraciones**

Para la validación de cualquier técnica analítica se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Validados (todo el material empleado)
- Calibrados o calificados según el caso (vortex, modulador de temperatura, baño maría, horno despirogenizador, micropipetas)
- Material de vidrio despirogenizador (tubos de ensayo)
- El material plástico debe ser apirógeno (puntas apirógenas)

## Equipos, materiales y reactivos que se usan en las pruebas de conejos y de LAL

Figura 7. Equipos Laboratorio Probiol



### VORTEX

**Marca:** Heidolph Reax Control

Se calibra una vez al año, por la empresa (balanza, temperatura, presión, humedad Ltda) TPH



### MODULADOR DE TEMPERATURA

**Marca:** Scientific Products

Se calibra una vez al año, por la empresa (balanza, temperatura, presión, humedad Ltda TPH



### BAÑO MARÍA

**Marca:** Memmert

Se calibra una vez al año, por la empresa (balanza, temperatura, presión, humedad)



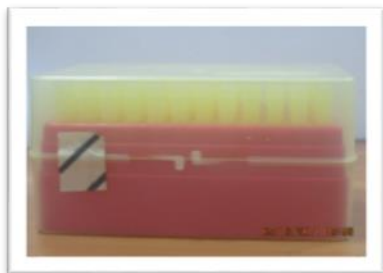
### HORNO DESPIROGENIZADOR

**Marca:** Binder

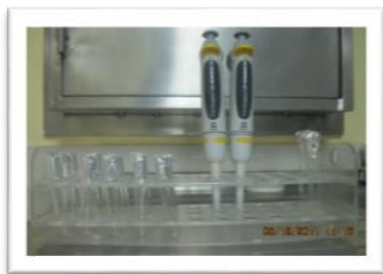
Se calibra una vez al año, por la empresa (balanza, temperatura, presión, humedad)



**Figura 8. Materiales**



**PUNTAS PARA MICROPIPETA**  
 Marca: Eppendorf  
 Apirógenas de 100µl



**MICROPIPETAS DE 100µl**  
 Marca: Brand

- **TUBOS DE ENSAYO:**  
 Tubos de 10 x 75 mm y de 16 x 150 mm
- **GRADILLA**

Fuente: Laboratorio Probiol S.A

**Figura 9. Reactivo LAL y endotoxina**



**ENDOTOXINA**

Control de endotoxina estándar (CSE)

Endotoxina 0.06

Endotoxina 0.03

Endotoxina 0.015

Endotoxina 0.0075

**REACTIVO LAL**  
*(Limulus Amebocyte Lisado Polyphemus)*

Fuente: Laboratorio Probiol S.A

## **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  $\beta$ -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 (Dawson, 2005).

## Metodología

Este estudio, se llevó a cabo en 3 fases:

- I. **PLANIFICACIÓN DE LA REVISIÓN DE ALCANCE:** En esta fase, se desarrollaron las siguientes actividades:
  1. Se definió el problema de investigación: Un laboratorio colombiano y productor de sueros antiofídicos (PROBIOL), entró en contacto con la Universidad Nacional de Colombia para realizar la validación de la prueba LAL con antivenenos ofídicos. La pandemia del covid, impidió la realización de actividades intralaboratorio por el confinamiento. Al estudiarse la temática de pruebas de pirogenicidad *in vivo* e *in vitro* y su aplicación en sueros antiofídicos, se encuentra con poca información disponible, y logra identificarse un vacío en la literatura.
  2. Delimitación del problema de investigación: Se llevó a cabo, al realizarse una primera aproximación por medio de la literatura y también en conversaciones que la autora tuvo con PROBIOL y con el Instituto Nacional de Salud en Colombia, en donde se encuentra que el método más usado es el *in vivo*, pero en ocasiones también usan el método LAL al tener novedades con la prueba en conejos. Se decide finalmente involucrar en este estudio la prueba *in vivo*, así como las pruebas LAL y MAT.
  3. Formulación de la pregunta de investigación: Teniendo en cuenta lo encontrado en la literatura, mediante una búsqueda inicial, junto a la información recopilada con los laboratorios colombianos y teniendo en cuenta la necesidad real, se procedió a trabajar en la formulación de la pregunta de investigación.
  4. Elaboración del protocolo de investigación para la revisión de alcance: Se usó como base, las indicaciones y recomendaciones del instituto Joanna Briggs.

## II. ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

Se elaboró un protocolo de investigación que contenía los siguientes apartados:

- Título
- Resumen
- Introducción
- Marco teórico
- Justificación
- Planteamiento del problema
- Objetivos
- Hipótesis
- Metodología
- Aspectos éticos
- Recursos –financiamiento y factibilidad
- Cronograma
- Bibliografía

Este protocolo fue escrito para elaborar la revisión, el cual fue presentado en Seminario III, donde fue aprobado y luego fue sometido al comité de ética de la facultad de ciencias para su aprobación. También se usó la herramienta RevMan 5.

## III. METODOLOGÍA PARA LLEVAR A CABO LA REVISIÓN:

Una vez el protocolo de investigación fue aprobado, se llevó a cabo la revisión, realizándose las siguientes actividades:

1. Formulación de la pregunta y criterios de elegibilidad de la evidencia: En este trabajo, se llevó a cabo una revisión de alcance o Systematic Scoping Review (SSR), donde se evocó la evidencia disponible, e identifican lagunas del conocimiento, ya que la información disponible es compleja de abordar y heterogénea. La Población, Concepto y Contexto guía de esta revisión fueron:

**Población:** Sueros antiofídicos monovalentes y polivalentes

**Concepto:** Pruebas de pirogenicidad

**Contexto:** Determinación de pirogenicidad

2. Selección de estudios y tamizaje de referencias

**Criterios de Inclusión por Diseño:** ensayos de laboratorio, estudios primarios de exactitud diagnóstica, que los desenlaces objeto de estudio estuvieran relacionados con las pruebas de pirogenicidad *in vivo* e *in vitro* (prueba de LAL y MAT) en sueros antiofídicos, siguiendo las directrices y lineamientos de Joanna Briggs Institute (JBI). No se tuvo restricción por idioma, ni por tiempo de publicación.

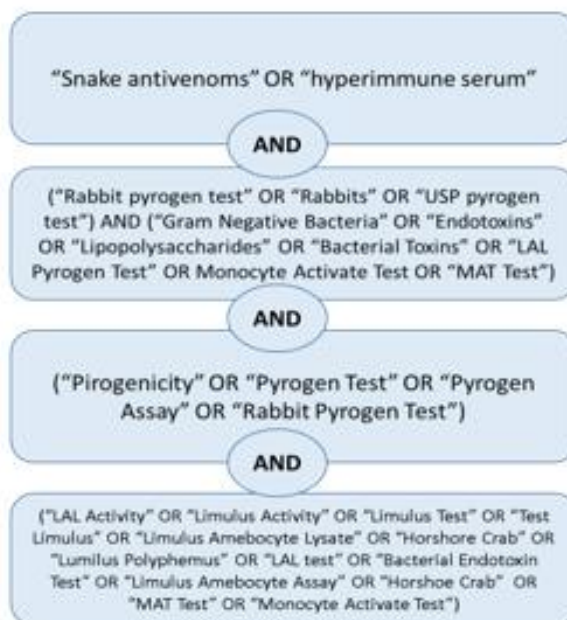
**Criterios de Inclusión por Población:** Estudios que evaluaron y compararon, pruebas alternativas *in vitro* (LAL o MAT), con la prueba gold estándar *in vivo*, para evaluar la pirogenicidad en sueros antiofídicos monovalentes y/o polivalentes.

Criterios de Inclusión por Contexto de Origen: Estudios cuya base sean estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar la pirogenicidad en sueros antiofídicos.

**Criterios de Exclusión:** estudios que solamente evaluaron un tipo de prueba de pirogenicidad en sueros antiofídicos y/o que no evaluaron pirógenos en éstos antivenenos.

### **Estrategia de Búsqueda**

Se inició con la selección de bases de datos de interés. Luego se definió el uso de Términos MeSH (Medical Subject Headings) como los siguientes términos: Snake antivenoms, anthiophidic serum, hyperimmune serum, Rabbit Pyrogen Test, USP pyrogen test, pyrogen assay, bacterial test, LAL Pyrogen Test, *Limulus Amebocyte Lysate* test, Monocyte Activate Test, MAT Test. Como términos DeCS (Descriptores en Ciencias de la Salud): Antivenenos de serpiente, suero antiofídico, suero hiperimmune, test de pirógenos en conejos, test de pirógenos USP, ensayo de pirógenos, test de bacteria, test de pirógenos LAL, test *Limulus Amebocyte Lysate*, test de monocitos activados, Test de MAT. Finalmente se usaron operadores Booleanos (AND-OR), (Filters 2009-2020), luego se desarrolló el planteamiento de una Ecuación (Fig.10) para cada base de datos: PubMed, Embase, Medline LILACS, Scopus, Web of Science y otros recursos como Wiley, Google Scholar, OpenGrey y la biblioteca central de Cochrane.

**Figura 10. Ecuación de Búsqueda Estratégica**

Fuente: Elaboración Propia

### Selección de los estudios

Tras haber definido la ecuación de búsqueda estratégica se ordenó en una tabla de Excel los artículos de cada base de datos, donde se extrajo, inicialmente, la información general de cada artículo: título, autores, año de publicación, DOI, y resumen. Posteriormente, cada una de las revisoras, de forma independiente y tras eliminar las réplicas, definió la inclusión o no, teniendo un consenso para la toma de la decisión. Los artículos seleccionados en primera revisión, se obtuvieron en texto completo, y se revisaron a detalle estableciendo si cumplían con los criterios definidos, y se registraron las razones de exclusión; seguido a esto se generó una segunda revisión. Todo lo anterior quedó registrado en el diagrama de flujo PRISMA. Igualmente, se evaluó la calidad científica de los test involucrados en los estudios finales seleccionados, y para ello, se usó el formato de evaluación de calidad ToxRTool (Herramienta de evaluación de confiabilidad de datos toxicológicos) (Schneider et al., 2009). Consiste en una lista de verificación de calificación de 21 puntos, que considera los aspectos metodológicos de cada estudio, como la identificación de la sustancia de prueba y el sistema de prueba, el diseño del estudio y la documentación de los resultados, donde los artículos con menos de 13 puntos se

consideran poco confiables, los estudios con 13–17 los puntos son confiables con posibles restricciones, y los estudios con 18–21 puntos se consideran confiables sin restricciones (Schneider et al., 2009).

### 3. Evaluación de la calidad de los estudios y extracción de la evidencia

#### **Tipos de Resultados Evaluados**

**Desenlace primario:** Se evaluó la evidencia sobre la capacidad de las pruebas LAL y MAT versus la prueba gold estándar *in vivo*, evaluando la pirogenicidad en sueros antiofídicos.

#### **Desenlaces secundarios**

- Se determinaron las características principales de las pruebas LAL, MAT e *in vivo* para ensayos de pirogenicidad en sueros antiofídicos.
- Se identificaron estudios relevantes publicados en bases de datos indexadas que permitieron comparar las pruebas LAL y MAT, con la prueba *in vivo* en conejos, para la evaluación de pirogenicidad en sueros antiofídicos.
- Se especificó información relevante sobre las ventajas y desventajas del uso de las pruebas *in vitro* LAL y MAT, junto a la prueba en conejos, para evaluar la pirogenicidad de sueros antiofídicos.

#### **Extracción de datos**

Tras definir qué estudios ingresaron a revisión según consenso, se procedió a diligenciar un formato en Excel, con datos que permitieron un análisis cualitativo y una síntesis de la evidencia disponible, incluyéndose la siguiente información:

Tipo de estudio, título, autores, año, nombre de la Revista, idioma, nombre del compilador, país del estudio, financiamiento, conflictos de interés y lo siguiente:

- Pruebas de pirogenicidad *in vitro*: ¿fueron realizadas bajo una guía científicamente validada?, si es así, ¿cuál(es) se usó(aron)?, prueba(s) *in vitro* desarrollada(s), técnica usada de la prueba elegida, desarrollo de la(s) prueba(s), resultados y desenlaces obtenidos, ¿se comparó con la prueba standard *in vivo*?, características de las pruebas y su desempeño específico al evaluar sueros antiofídicos, principales conclusiones obtenidas.

- Prueba de pirogenicidad *in vivo*: ¿fue realizada bajo una guía científicamente validada?, si es así, ¿cuál(es) se usó (aron)?, detalles del desarrollo de la prueba, resultados y desenlaces obtenidos, principales conclusiones obtenidas.
- Suero antiofídico: # de muestras testeadas, tipo de antiveneno usado.

**Sesgos:** No aplica para una Systematic Scoping Review

#### 4. Síntesis de la evidencia: análisis y presentación de resultados

##### **Análisis**

**Desenlace principal:** Se hizo una descripción cualitativa de los test *in vitro* MAT y LAL, para evaluar su potencial reemplazo con la prueba gold standard *in vivo*, en la evaluación de la pirogenicidad en sueros antiofídicos.

**Desenlaces secundarios:** Se llevó a cabo una descripción de las principales recomendaciones al plantear las pruebas *in vitro* para la evaluación de la pirogenicidad de sueros antiofídicos, relacionado con su desempeño específico, si se tiene en cuenta la naturaleza de los antivenenos.

##### **Presentación (Síntesis) de los resultados**

Inicialmente se diligenció un diagrama de flujo PRISMA que definió el proceso para identificar los estudios que entraron a la revisión y los que fueron excluidos. El componente descriptivo se realizó con los datos extraídos y consignados en el formulario de recolección.

Posteriormente se recopiló toda la información recolectada en formato de resumen, que da cuenta, del análisis en conjunto, así como de la direccionalidad de los efectos. Los datos fueron sintetizados de forma descriptiva. Se presentan los resultados según las pruebas y técnicas usadas y su desempeño evaluando pirogenicidad en sueros antiofídicos, si se tiene en cuenta la naturaleza propia de éste, el tipo de suero evaluado y la comparación con la prueba gold standard (*in vivo*).

#### 5. Interpretación de los resultados:

**Resultados Finales:** Sin uso de filtros ni por tiempo de publicación, y sin restricción de idioma, los resultados obtenidos se exponen y se clasifican en un gráfico.



## Resultados

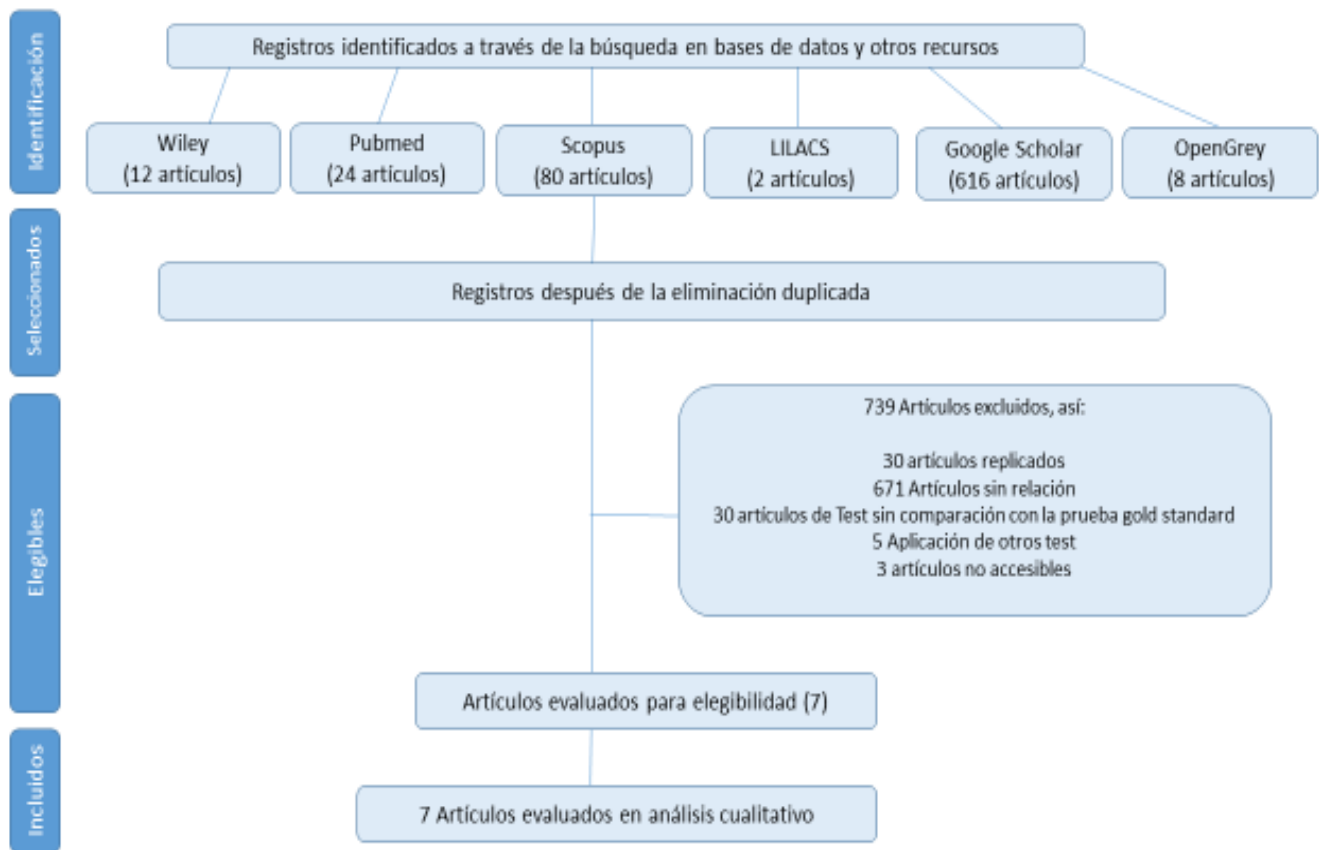
El problema de investigación de este estudio se resume en poder conocer si se puede o no, considerar como sustitutos de la prueba en conejos (*in vivo*), a las pruebas LAL y MAT (*in vitro*), para la evaluación de la pirogenicidad en sueros antiofídicos. Para ello, se delimitó dicho problema de investigación, solo a las pruebas de pirogénos anteriormente mencionadas, que son las que más frecuentemente se usan, en antivenenos ofídicos, en Colombia, según conversaciones con personal del Instituto Nacional de Salud y laboratorios Probiol; así como lo que se pudo encontrar al realizar el marco teórico y la revisión de alcance de esta tesis. Fue así, como la pregunta de investigación formulada para este trabajo fue: ¿Las pruebas *in vitro* (*Limulus Amebocyte* Lysate test (LAL) y Test de Monocitos Activados (MAT)) podrían considerarse como sustitutas de la prueba de pirogénos en conejos para evaluar pirogenicidad en sueros antiofídicos?.

### Búsqueda y selección de la evidencia

La selección inicial se realizó basándose en los resúmenes y títulos de la información disponible identificando los artículos potencialmente elegibles, sin uso de filtros ni por tiempo de publicación, y sin restricción de idioma. La búsqueda recuperó 742 referencias después de eliminar las réplicas (Figura 11). No fueron accesibles 3 artículos. Después de la eliminación de 739 artículos por criterios de exclusión, quedaron 7 artículos para el análisis cualitativo. La valoración crítica de los estudios seleccionados reveló una calidad relativamente homogénea ya que los enfoques metodológicos están armonizados por las diversas farmacopeas, aceptadas por los diferentes entes regulatorios a nivel internacional (Tabla 7). Así 4 de los estudios se consideraron como “confiables sin restricciones”, y los 3 restantes calificaron como “confiables con restricciones”.

Los problemas metodológicos relacionados con la caracterización del organismo de prueba (conejos para la prueba RPT) fueron una fuente de diferencia entre los estudios. Algunos estudios omitieron una descripción del número de animales adultos sanos, probablemente porque estos parámetros ya están prescritos en los protocolos estandarizados que declararon seguir.

**Figura 11. Diagrama de flujo de proceso de selección de estudios, según PRISMA**



Fuente: Creación propia de la autora

## Tamizaje de referencias y selección de estudios

### Descripción de los estudios

A continuación, se realizará la descripción de los estudios considerados para la revisión:

**Solano et al., 2015** realizaron un estudio en donde compararon la capacidad de la prueba LAL con la prueba en conejos, para evaluar la contaminación de endotoxinas en antivenenos, y encontraron que ambos métodos pueden detectar todas las concentraciones de endotoxinas en el rango de las especificaciones del antídoto. Concluyeron que, aunque el ensayo LAL puede ser utilizado para evaluar el contenido de endotoxinas a lo largo del proceso de fabricación del antídoto, recomiendan que las liberaciones de los productos finales se basen en los resultados de ambos métodos. El antiveneno usado por los autores, fue fabricado por el Instituto Clodomiro

Picado (lote 4410209POLQ), a partir del plasma de caballos inmunizados con venenos de las serpientes *Bothrops asper*, *Crotalus simus* y *Lachesis stenophrys*. La prueba de pirógenos en conejos la realizaron en grupos de ocho conejos de Nueva Zelanda (con un peso de 2,0 a 3,0 kg) que fueron colocados en cajas de contención. Después de un periodo de estabilización de 30 min. registraron la temperatura rectal basal. Los conejos fueron inyectados en la vena marginal de la oreja con una dosis de 3 mL/kg con diferentes concentraciones de LPS estándar (*E. coli* 0113:H10) suspendida en solución salina estéril o antiveneno, o con una sola concentración de endotoxina suspendida en antiveneno. Cambios en la temperatura corporal se registraron cada 10 min durante 3 h después de la inyección. La determinación de la dosis pirogénica se repitió ocho veces, y la dosis pirogénica promedio (APD) se calculó como la aritmética media de las ocho repeticiones. El efecto de la reutilización del conejo en el test de pirógeno fue analizado por la inyección repetidamente de un solo lote de antiveneno al mismo grupo de animales. Las repeticiones se realizaron en 11, 25 y 46 días después de la primera inyección. La interpretación de resultados se realizó de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos 2014. El ensayo LAL fue realizado utilizando el método de Gel-Clot ó coágulo de gel. En ausencia de LPS, la inyección de solución salina o antiveneno indujo cambios de  $0,2 \pm 0,2$ -C en la temperatura corporal de los conejos. Después de la inyección intravenosa de LPS disuelto en solución salina y antiveneno, los conejos aumentaron su temperatura corporal de forma dependiente de la dosis. Cuando compararon ambos solventes, no se observaron diferencias significativas entre la solución salina y el antiveneno en la respuesta de los animales en todas las concentraciones probadas a excepción de 20 UE/kg. Cuando se usó solución salina y antiveneno como diluyente, la dosis pirogénica promedio (DPA) se estimó en  $5,0 \pm 2,5$  UE/kg y  $6,1 \pm 7,5$  UE/kg respectivamente. La diferencia entre estos resultados no fue significativa. Estos resultados sugieren que esta formulación de antiveneno no contiene sustancias que interfieran con la RPT. Los resultados mostraron que para dar un resultado positivo de acuerdo con las especificaciones de la USP, se requiere la administración del LPS a 5,0 UE/kg para ambos disolventes. Los resultados mostraron que 5,0 EU/kg (es decir, la dosis pirogénica promedio y la cantidad de LPS requerida para fallar una prueba USP de pirógenos) indujo un aumento de temperatura que es significativamente diferente de los incrementos inducidos por la solución salina no enriquecida, y no fue diferente cuando se usó antiveneno no enriquecido. Estos resultados pueden explicarse como consecuencia de la inestabilidad intrínseca del animal que se evidenció por incrementos en la temperatura de los animales inyectados con cualquiera de los solventes no enriquecidos. Esta característica del modelo animal hace que la prueba sea susceptible de dar resultados falsos positivos. Las observaciones de los autores de éste artículo,

también mostraron que la reutilización de conejos induce un aumento de temperatura proporcional al número de veces que se inyectaron los animales. Por lo tanto, un solo lote de antiveneno pasó la prueba inicial de pirógenos, pero falló la segunda, tercera y cuarta repeticiones. Los resultados sugieren que, a diferencia de otras formulaciones derivadas de sangre (Ochiai et al., 2010), el antiveneno evaluado en este estudio, no contenía factores que interfirieran con la reacción de LAL y, por lo tanto, puede probarse mediante el ensayo LAL. Este hallazgo no se puede generalizar a otros antivenenos, ya que sus métodos de fraccionamiento y composición pueden diferir. Por último, estos autores también quisieron trabajar con la determinación de endotoxinas ambientales mediante ambos ensayos (*in vivo* y LAL), cuyos resultados sugieren que diversas endotoxinas ambientales ajustadas a la misma actividad LAL podrían producir diferente pirogenicidad en el modelo de conejo. Por lo tanto, aunque el ensayo LAL se puede utilizar durante todo el proceso de fabricación del antiveneno, los autores recomiendan que la liberación de antivenenos finales cumpla con las especificaciones tanto para el RPT como para el ensayo LAL. Por ello, el uso de LAL lo recomiendan para seguir la contaminación por endotoxinas durante todo el proceso de fabricación del antiveneno. Sin embargo, la liberación de los productos finales también debe basarse en los resultados del RPT. Incluso cuando los antivenenos pasan ambas pruebas, una reacción pirogénica podría ser inducida por un mecanismo que involucra la formación de complejos inmunes formados por anticuerpos heterólogos e inmunoglobulinas hacia las proteínas del antiveneno.

**Fingola et al., 2013**, tuvieron como objetivo en su estudio, la validación intralaboratorio del uso de un ensayo LAL cromogénico cinético para detectar endotoxina bacteriana en suero antibotrópico (ABS), como sustituto de la prueba clásica de pirógenos en conejo, determinando el límite de endotoxina permisible (EL) y la dilución máxima válida (MVD) para ABS. Este ensayo utilizó una preparación de LAL, en combinación con un fotómetro de incubación y un software adecuado para detectar fotométricamente la endotoxina. En sus conclusiones refirieron que el ensayo LAL cromogénico cinético se consideró válido para la determinación de endotoxina bacteriana en muestras de ABS, ya que cumplió con los parámetros de desempeño descritos en el protocolo de validación. Para ABS, el EL establecido fue de 2,9 EU/mL y el MVD se determinó en 1:580. Los autores recomiendan que el ABS se diluya a 1:10 en los ensayos de rutina para la determinación de endotoxinas. Sin embargo, se puede utilizar cualquier dilución por debajo de la MVD.

**Fingola et al., 2019**, tuvieron como objetivo estudiar el ensayo LAL aplicado a antivenenos anticrotáticos (SAC), antiescorpión (SAE), antirrábico (SAR) y antitetánico (SAT). La novedad de este trabajo consistió en las concentraciones evaluadas para los cuatro tipos de sueros, ya que aún no se han establecido límites de concentración en ninguna Farmacopea, a pesar de que desde 1983 se aboga por la prueba LAL. Así, evaluar estas concentraciones permite evaluar el uso de la prueba LAL en éstos tipos de antivenenos. La prueba de pirógenos en conejo cubre una gama más amplia de sustancias y es capaz de detectar pirógenos tanto endotóxicos como no endotóxicos. De todos modos, eso es menos sensible que lo que se puede evaluar en las pruebas *in vitro*, utiliza muchos conejos y no se puede determinar la cantidad de endotoxinas presentes en una muestra, ya que se trata de una prueba cualitativa (Nakagawa et al., 2002). Además, el ensayo de pirógenos que utiliza sangre humana también presenta una serie de dificultades, como la dificultad para obtener muestras de sangre humana, mientras que los kits también son extremadamente caros. Debido a problemas éticos, esto hace que los experimentos sean prácticamente inviables. Por lo tanto, se deben buscar ensayos alternativos. En este contexto, éste trabajo aplicó la prueba LAL porque, según sus autores, es mucho más accesible en cuanto a kits, reactivos, no involucra problemas éticos y presenta valores que permiten a los laboratorios de control de calidad utilizarlos con calidad, eficiencia y bajo costo. La prueba de inhibición-potenciación aplicada para el ensayo LAL indicó que la dilución de trabajo utilizada para los sueros fue 1:10, excepto para el suero anti-escorpión, donde se usó una dilución 1:100. La FDA y la USP recomiendan no trabajar con muestras puras (sin diluir), para evitar interferencias, ni trabajar al límite utilizando la máxima dilución válida. Por lo tanto, todas las diluciones utilizadas para los cuatro sueros cumplieron con las recomendaciones de la FDA y la USP. Así, el estudio demostró que la prueba de pirógenos *in vivo* podría ser potencialmente sustituida por el ensayo LAL para todas las muestras de suero evaluadas que muestren una mayor sensibilidad y sigan el principio de las 3R (reducción, refinamiento y reemplazo), además de mantener el control de calidad en la Vigilancia Sanitaria.

**Fingola, 2011**, tuvo como objetivo validar la prueba *in vitro* de LAL (método cromogénico cinético) para suero antibotrópico, reemplazando la clásica prueba de pirógenos realizada en conejos. Para ello, evaluó los siguientes parámetros de desempeño: Selectividad, Linealidad/Curva Estándar, Precisión (Repetibilidad y Precisión Intermedia) y Exactitud. En las conclusiones, el autor consideró válido el ensayo LAL por el método cromogénico cinético para la determinación de endotoxina bacteriana en muestras de suero antibotrópico, ya que se cumplió con los parámetros de desempeño descritos en el protocolo de validación. El valor de

Concentración Límite de Endotoxinas del suero antibotrópico fue establecido  $\leq$  a 2,9 UE/ml. La Dilución Máxima Válida para el suero antibotrópico fue 1:580. El autor también recomienda una dilución 1:10 del suero antibotrópico en el ensayo de rutina para la determinación de endotoxinas, aunque se puede utilizar cualquier dilución por debajo de la Dilución Máxima Válida (MDV).

**Agudelo, 1999**, realizó en su tesis una valoración de endotoxinas bacterianas en sueros antiofídicos de origen equino y una optimización de métodos en el control de calidad. Evaluó pirógenos, tanto en el suero usado para crear los antivenenos, como en los sueros antiofídicos finales. En sus resultados, no detectó presencia de pirógenos en el plasma, ni por la prueba en conejos, ni por LAL (Gel-Clot), por el contrario, si encontró pirógenos en el suero antiofídico como producto terminado, por ambas pruebas mencionadas. También, en la línea del proceso, la identificación de endotoxinas bacterianas en los materiales y equipos, permitió la ubicación de los puntos críticos en las etapas de elaboración del suero antiofídico. Dentro de las principales referencias de este trabajo, destacan la variación de respuesta biológica de los conejos, que hace que sea una prueba susceptible a circunstancias de tipo externo que inciden en los resultados, a diferencia de la prueba LAL, donde los factores que inciden son controlados, a pesar de ello las ventajas de usar una prueba *in vivo* para los antisueros en producto terminado, es que involucra una respuesta similar a la humana. Dentro de sus conclusiones más importantes, resalta que como prueba de control de calidad de producto terminado, se puede utilizar la prueba en conejos o adoptar la técnica de LAL para la liberación del suero antiofídico por la presencia de endotoxinas, y para el control en materia prima y del proceso recomienda la técnica de LAL.

**Agostini et al., 2018**, en su trabajo evaluaron el uso de un kit comercial de la prueba de activación de monocitos (MAT) para evaluar la contaminación pirogénica de sueros hiperinmunes. Probaron tres lotes de sueros, dos libres de pirógenos y uno pirógeno. La recuperación del pico de endotoxina indicó que las diluciones de muestra de 1/2 a 1/10 son adecuadas. También evaluaron las condiciones de transporte y almacenamiento del kit, comprobándose que se debe asegurar una adecuada cadena de frío para lograr buenos resultados. Además, el kit comercial MAT parecía adecuado para reemplazar la prueba de pirógenos de conejo (RPT) para la prueba de pirógenos de sueros hiperinmunes, aunque se necesitan más pruebas para una validación completa. No se utilizaron animales en este estudio; las muestras fueron probadas en conejos por el control de calidad interno del Instituto Butantan,

de acuerdo con las recomendaciones de la Farmacopea Brasileña para la liberación de lotes de rutina (Brazilian Pharmacopoeia, 2010).

**Caldeira et al., 2016**, tuvieron como objetivo en su estudio realizar una comparación paralela del RPT y MAT para lotes de sueros hiperinmunes (HS) analizados durante la rutina de un laboratorio de control de calidad. MAT se realizó en los mismos 43 lotes de HS previamente probados usando RPT. Los resultados mostraron que MAT presentó 100% de sensibilidad y aproximadamente 85% de especificidad en comparación con RPT, es decir, no se obtuvieron resultados falsos negativos. Pocas muestras sospechosas, que dieron negativo en el RPT después de repetir la prueba, proporcionaron resultados positivos divergentes que sugerían un límite inferior de detección de MAT. Por lo tanto, MAT puede detectar contaminantes en productos biológicos como los lotes de HS. La comparación entre los 2 métodos de MAT deben investigarse más a fondo en estudios futuros, ya que hay pocos datos en la literatura que comparen los dos métodos para muestras de cualquier producto inyectable. El estudio actual mostró que MAT presentó los mismos resultados que RPT cuando RPT fue definitivamente negativo o positivo. En los casos en que el resultado de RPT fuera sospechoso (se requiriera una prueba repetida con cinco conejos diferentes), MAT podría presentar un resultado diferente y nunca se produjo un resultado falso negativo con MAT. Estos hallazgos muestran que el MAT es más sensible que el RPT y puede detectar la pirogenicidad antes que el RPT. Teniendo en cuenta la seguridad de los usuarios, es preferible un falso positivo a un falso negativo.

## Comparación conjunta de pruebas RPT, LAL y MAT

En la siguiente tabla, se llevó a cabo una comparación entre los diversos métodos de evaluación de pirógenos trabajados en esta revisión de alcance:

**Tabla No. 6.** Comparación entre métodos de detección de pirógenos

Prueba de pirogenicidad	<i>In vivo</i> : Prueba de pirógenos en conejos (RPT)	1ra generación <i>in vitro</i> : Prueba de Limulus Amebocito Lisado (LAL)	2da generación <i>in vitro</i> : Prueba de Activación de Monocitos (MAT)
Sistema de prueba	Conejos	Hemolinfa del cangrejo herradura	Células monocíticas humanas
Principio de la prueba	Fiebre	Defensa de artrópodos	Fiebre humana
Especificidad	Todos los pirógenos	Endotoxina	Todos los pirógenos
Límite de detección	5 UE/ml	0.03-0.005 UE/ml	0.03 UE/ml
Tipo de prueba	Prueba de límite	Ensayo límite/cuantitativo	Ensayo límite/cuantitativo
Aplicaciones	Productos farmacéuticos, productos biológicos, dispositivos médicos	Productos farmacéuticos, productos biológicos (limitado), dispositivos médicos (extracto), aire y polvo (limitado)	Productos farmacéuticos, productos biológicos, dispositivos médicos (extracto/dilución), productos de sangre, aire y polvo
Beneficios	Detecta todos los pirógenos, estándar de oro de las pruebas de pirógenos	Rápido, fácil ejecución, reducción del tiempo de análisis, se pueden analizar varias muestras simultáneamente, la puede correr una persona solamente, es un ensayo cuantitativo, duración de la prueba 2 horas en promedio	Detecta todos los pirógenos, rapidez, fácil ejecución, reducción del tiempo de análisis, aplicable a todos los productos, es un ensayo cuantitativo
Desventajas	Variabilidad biológica, No aplicable a todos los productos, alto costo de manutención de los animales, cuestiones éticas, no puede usar una gran cantidad de animales simultáneamente, necesita mínimo 2 personas para su realización, no es un ensayo cuantitativo, duración de la prueba 6 horas en promedio	Detecta sólo endotoxinas, no aplicable a todos los productos, no detecta endotoxinas unidas, cuestiones éticas	Necesidad de validación de productos no incluidos en la validación del método, cualificación de matrices celulares, altos costos
Aceptación de entes reguladores	Principales farmacoepas (FB, USP, FE, JP, IP, BP)	Principales farmacoepas (FB, USP, FE, JP, IP, BP)	Aceptación FE y FDA

Fuente: UE: unidades de endotoxina, FB: Farmacopea Brasileña, USP: Farmacopea de los Estados Unidos, FE: Farmacopea Europea, JP: Farmacopea Japonesa, IP: Farmacopea India, BP: Farmacopea Británica, FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos. Adoptado y modificado de Melandri al. 2010, Cristina et al., 2015 y Fingola, 2011.



## Valoración de la calidad de los estudios

**Tabla No. 7. Evaluación de calidad de los artículos**

Artículo	Grupo I: Identificación de la sustancia de prueba	Grupo II: Caracterización del sistema de ensayo	Grupo III: Descripción del diseño del estudio	Grupo IV: Documentación de los resultados del estudio	Grupo V: Plausibilidad del diseño y los datos del estudio	Total	Categorización
Solano et al., 2015	4	3	7	2	2	18	Confiable sin restricciones
Fingola et al., 2013	4	3	5	3	2	17	Confiable con restricciones
Fingola et al., 2019	4	4	6	3	2	19	Confiable sin restricciones
Fingola, 2011	4	4	7	3	2	20	Confiable sin restricciones
Agudelo, 1999	4	4	6	3	2	19	Confiable sin restricciones
Agostini et al., 2018	3	3	6	3	2	17	Confiable con restricciones
Caldeira, et al., 2016	3	4	5	3	2	17	Confiable con restricciones

Tabla de valoración de calidad de artículos, elaborada por la autora, realizada según el ToxRTool (Schneider et al., 2009)

## Síntesis de la evidencia

La extracción de la información principal de los 7 estudios incluidos en esta revisión de alcance, fueron trabajados en una tabla en excel, en donde se realizó una división de los que trabajaron la prueba LAL (5 de ellos) y los que lo hicieron con MAT.

## **Resultados de los artículos incluidos**

### **Número de estudios**

De los 7 artículos incluidos, 5 evaluaron la técnica LAL (de los cuales 3 usaron la técnica cromogénico cinético cuantitativo y los 2 restantes lo hicieron con la técnica Gel-Clot), mientras sólo 2 lo hicieron con MAT. Ningún artículo comparó entre los diferentes métodos existentes de las pruebas *in vitro* LAL (Ver Anexo A).

### **Año de publicación de los estudios**

Al discriminar por año de publicación, se encontró que el primer artículo escrito sobre el tema, se desarrolló en el año 1999. El siguiente se escribió hasta el año 2011; siendo el más reciente elaborado en el año 2019. Si bien en total hay una brecha de 20 años entre todos los estudios, hay una brecha de 12 años entre el primer artículo en el año 1999 y el siguiente, hasta el 2011. La totalidad de los artículos se llevaron a cabo en diferentes años (Ver Anexo A).

### **Países de elaboración de estudios**

Todos los estudios fueron desarrollados en países latinoamericanos, siendo Brasil el país con más representación (5 artículos), y Colombia, junto a Costa Rica, con 1 estudio cada uno (Ver Anexo A).

### **Farmacopeas usadas como base**

Los protocolos para las pruebas *in vivo* e *in vitro* desarrolladas en los artículos seleccionados, fueron adaptados de la farmacopea de los Estados Unidos (USP) en 5 de los artículos (71% de todos los trabajos seleccionados), mientras que los 2 restantes, se basaron en la farmacopea Brasileña.

## Discusión

La prueba en conejos, ha sido y sigue siendo en la actualidad, la prueba más usada para evaluar pirógenos en sueros antiofídicos, según se pudo evidenciar en esta revisión de alcance. Esto, debido a su aceptación, como primera prueba para evaluar pirógenos, en diferentes farmacopeas (De Agostini et al., 2018). La técnica de LAL, se puede considerar como la segunda más usada en laboratorios de producción de sueros antiofídicos. Es innegable que LAL ha desempeñado un papel importante en la reducción del uso de conejos para las pruebas de pirógenos, y en la mejora de la seguridad de los productos médicos (Negherbon et al., 2021), no siendo diferente, en sueros antiofídicos. Al ser ésta la prueba *in vitro* más antigua, puede explicar el por qué durante ésta revisión de alcance se encontraron más registros usándola, en comparación con la prueba MAT. Así., de los 7 estudios incluidos, el 71%; (5) de ellos evaluaron la prueba LAL con sueros antiofídicos, mientras que el 29%; (2) restante lo hicieron con MAT. Se considera, en lo que respecta al ensayo de pirógenos, que las múltiples limitaciones de los métodos existentes y la acumulación de conocimiento científico en el campo de la inmunología, contribuyeron al desarrollo de un método alternativo basado en el mecanismo de reacción de la fiebre en mamíferos, al que se le llamó Test de Activación de Monocitos (MAT) (Caldeira et al., 2016). Sin embargo, hacen falta mayores estudios que busquen mejores resultados sobre ésta temática, enfocada en la evaluación de pirógenos en sueros antiofídicos. Sobre todo si se tiene en cuenta que éstos son la única opción existente para el tratamiento directo a un paciente con accidente ofídico y su obligatoria evaluación de pirógenos.

### Prueba *in vivo* en conejos (RPT)

Entre los factores limitantes de esta prueba se encuentran el manejo de los animales, la confiabilidad de las pruebas (resultados falsos positivos o falsos negativos) (Solano et al., 2015; Hartung, 2021), el hecho de que no es cuantitativa, no tiene un diferencial de sensibilidad a pirógenos debido a la extrapolación interespecies (conejo/hombre) (ICCVAM, 2008), aplicabilidad restrictiva a un rango de productos farmacéuticos (radiofármacos, analgésicos,

biofármacos, fármacos inmunomoduladores y fármacos contra el cáncer) que no pueden probarse en conejos debido a los efectos de interferencia (Hartung, 2002) porque influyen en la regulación de la temperatura o provocan reacciones (Ver tabla 6). Así mismo, autores como Agudelo y Arias (2001), aseguran que dentro de los factores que influyen en la prueba *in vivo*, se encuentran la susceptibilidad de los conejos a las respuestas no específicas como estrés, el desarrollo de tolerancia a la endotoxina, y la restricción en el uso de muestras muy antigénicas entre otras.

En cuanto a la manipulación de animales, Solano et al., 2015, discutieron que como consecuencia de la inestabilidad intrínseca del animal, se evidenciaron incrementos en su temperatura con cualquiera de los animal hace que la prueba sea susceptible de dar resultados falsos positivos (Solano et al., 2015).

Diferentes autores reportan varios factores que pueden alterar la actividad pirogénica en los conejos, uno de ellos es el estado de madurez física del animal; como es el caso de los conejos inmaduros de pesos inferiores a 2kg que son significativamente más resistentes a la actividad pirogénica de las endotoxinas que los animales maduros de un peso de 2kg a 4kg, pero son menos sensibles a efectos emocionales durante la realización de la prueba (Agudelo, 1999). Otro factor mencionado son los estímulos que puedan alterar a los animales, por ello la importancia del personal que hace la prueba. Entre éstos pueden considerarse el stress al colocarse el termómetro, mala posición del animal en el cepo, la presencia de extraños en el área de trabajo, transporte de material o limpieza de las áreas aledañas durante el desarrollo de la prueba (Agudelo, 1999). La mayoría de laboratorios prefieren usar animales del mismo sexo para evitar estímulos emocionales entre machos y hembras (Caldeira et al., 2014).

Otro aspecto que se considera importante tener en cuenta y que los autores Solano et al., 2015 experimentaron en su estudio, es sobre la reutilización de conejos para detección de pirógenos en antivenenos. La reutilización de animales para el RPT ha sido una práctica común en la industria farmacéutica. Cuando se trata de preparaciones inmunogénicas como antivenenos, no se recomienda la reutilización de animales porque se pueden obtener resultados inexactos. Sus observaciones mostraron que la reutilización de conejos induce un aumento de temperatura proporcional al número de veces que se inyectaron los animales. Por lo tanto, en sus resultados, un solo lote de antiveneno pasó la prueba inicial de pirógenos, pero falló la segunda, tercera y cuarta repeticiones. Los mecanismos involucrados en esta creciente respuesta pirogénica pueden estar relacionados con la respuesta inmune que se desarrolla en los conejos contra las inmunoglobulinas equinas después de la primera y subsiguientes administraciones intravenosas

de antiveneno. La activación de varios mecanismos inflamatorios, es probable que afecten la respuesta pirogénica (Solano et al., 2015).

## Prueba de LAL

Aunque todas las bacterias tienen alguna asociación con la endotoxina, la fuente pirogénica más potente proviene de las bacterias Gram-negativas. Así, desde el punto de vista regulatorio, se tiene a LAL como la prueba oficial para la detección de endotoxinas, siendo un sustituto en lo posible del RPT como recomienda la USP “la prueba de pirógenos en conejos solo debe realizarse si el el producto es incompatible con la prueba LAL”, ya que la reacción involucra enzimas que pueden verse afectadas por varios factores inherentes al producto biológico (Cristina et al., 2015). (Ver Tabla 6).

Se sabe que varios componentes del plasma que se unen a endotoxinas enmascaran el ensayo LAL, ya que las características organolépticas del producto, como la turbidez y el color, pueden alterar los principios de medición. Debido a estas interferencias con el sistema de prueba, los sueros antiofídicos deben diluirse, respetando su dilución máxima válida (Agudelo, 1999).

La incapacidad de LAL para detectar otras fuentes potenciales diferentes de pirógenos (bacterias Gram-positivas, hongos y virus), no menos dañinas para la salud humana, no la convierte en un reemplazo completo de la RPT. Dado que la prueba se basa en el sistema de defensa de los artrópodos, no proporciona resultados tan relevantes para los humanos como el MAT (Cristina et al., 2015).

Con respecto a las variables de la prueba LAL, en lo revisado por la literatura y en los estudios incluidos, hubo 2 estudios que trabajaron la técnica Gel-Clot, mientras que 3 lo hicieron con el método Cromogénico cinético cuantitativo, y no se encontraron estudios con el método turbidimétrico, para evaluar sueros antiofídicos. Es así como Fingola et al., (2013) demostraron que el ensayo LAL cromogénico cinético se consideró válido para la determinación de endotoxina bacteriana en muestras de suero antibotrópico, ya que cumplió con los parámetros de desempeño descritos en el protocolo de validación. De la misma forma se encontró para los resultados obtenidos en los otros trabajos (Fingola et al., 2019 y Fingola, 2011). Al referirnos a la técnica Gel-Clot, tanto Solano et al., (2015), como Agudelo, (1999), las consideraron válidas, pero en ambos trabajos coincidieron, a partir de sus resultados y evaluando factores como los medio ambientales y el control de materia prima y del proceso, que lo ideal es el uso combinado de la prueba LAL con el test *in vivo* en conejos.

## Prueba MAT

MAT utiliza fuentes de monocitos humanos (sangre total y líneas celulares) como matriz, respetando el concepto de las 3R y excluyendo los riesgos inherentes a la extrapolación entre especies (Cristina et al., 2015). A pesar de las ventajas de MAT, como la aplicación *in vitro*, alta sensibilidad y reconocimiento de un amplio espectro de pirógenos que llevó a su aceptación como tercer método para la prueba de pirógenos por la Farmacopea Europea, algunas dificultades relacionadas con la aplicación de MAT quedan aún por superarse, como la obtención y calificación de matrices celulares, necesidad de validación del producto y mayor robustez científica, como argumenta el Comité Organizador Interinstitucional para la Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM) (Cristina et al., 2015).

MAT representa una nueva generación, como método alternativo *in vitro* debido a su refinamiento metodológico, ya que difiere en el origen de la matriz que responde a un potencial pirogénico (células humanas), hace uso de controles positivos y negativos, detecta una mayor variedad de pirógenos no LPS y confiere aplicabilidad a un espectro más amplio de productos (Hartung, 2021). El nuevo enfoque que da MAT mediante el uso de material humano contribuye a una mayor fiabilidad de la respuesta *in vitro*, ya que es una metodología basada en la respuesta inmune a pirógenos correspondiente a la condición de la especie humana, excluyendo los riesgos inherentes a la extrapolación interespecies presentes en LAL y en RPT.

A pesar de las ventajas de MAT, las restricciones prácticas y normativas relacionadas con el uso de sangre fresca o monocitos asociados a la flebotomía, necesidad de donantes y la evaluación previa de agentes infecciosos son factores relevantes para la implementación de la prueba (Ochiai et al., 2010). Así, se han estudiado varias alternativas con el fin de optimizarla y hacerla aplicable a gran escala, es decir para su uso, en las industrias farmacéutica y biotecnológica. Como alternativas al uso de sangre fresca, se validó el uso de sangre crioconservada y células de estirpe monocítica (MONOMAC-6) en el MAT (Cristina et al., 2015). Pero no se reportaron aún estudios de éste tipo para evaluación en sueros antiofídicos. En la literatura se han descrito otras aproximaciones a los sistemas celulares como donantes de células monocíticas, por ejemplo, el uso de sangre de conejo y sangre bovina. Sin embargo, estos enfoques estarían lejos del principio de las 3R, ya que mantienen el uso de animales, además de mantener la limitación de la extrapolación interespecies de las pruebas (Cristina et al., 2015).

En vista de los puntos señalados, MAT es un sustituto potencial para probar pirógenos en muchos productos biológicos, como los sueros antiofídicos, sin embargo, hasta el momento su uso solo

ha sido validado para algunos medicamentos, lo que ha llevado a las agencias reguladoras a exigir la validación de la aplicabilidad de la prueba por producto (Caldeira, 2018). De igual forma, en lo encontrado en ésta revisión de alcance, sólo 2 de los estudios analizaron MAT con sueros antiofídicos, siendo importante recalcar que ambos estudios reportaron importantes conflictos de intereses, en donde alguno de los autores se encontraba ligado directamente con casas comerciales productoras de kits MAT.

## **Comparación conjunta de pruebas RPT, LAL y MAT**

En la comparación directa entre las pruebas base de esta revisión de alcance (Tabla 6), MAT, ha reducido el tiempo de procesamiento y proporciona el mismo nivel de seguridad para los productos. En cuanto a la sensibilidad, MAT es superior al RPT, además de ser una evaluación cuantitativa de pirógenos, lo que facilita la determinación exacta del contenido de pirógenos en una muestra. Como MAT detecta otros pirógenos que no son endotoxinas, los resultados se presentan como unidades equivalentes de endotoxinas por ml (EEU/mL) (De Agostini et al., 2018). La cantidad de pirógeno está relacionada con el nivel de liberación de citoquinas que se calcula a partir de valores de densidad óptica medidos por el ensayo ELISA y referidos a concentraciones de un estándar internacional de endotoxinas. MAT también permite diferenciar entre los efectos de los pirógenos y los factores de interferencia, ya que ciertos productos pueden inducir un aumento o una inhibición en la liberación de citocinas y otros mediadores de la respuesta pirogénica, lo que no es distinguible en los ensayos RPT y LAL (Nakagawa et al., 2002). La técnica MAT tiene otra ventaja en comparación con LAL y RPT, que es la gama más amplia de clases de productos que se pueden analizar, incluyendo sueros hiperinmunes, pero también productos biofarmacéuticos, vacunas y contaminación del aire (Schindler et al., 2009). Múltiples autores consideran que la prueba de LAL o endotoxina bacteriana no puede reemplazar completamente a la RPT, ya que, por definición, es una prueba de detección de endotoxinas, no una prueba de pirógenos, ya que no reconoce otras clases de pirógenos como Gram-positivos, hongos, virus y toxoides; esto en acuerdo con lo concluido por autores con trabajos seleccionados dentro de esta revisión, como Agudelo (1999) y Solano et al., (2015).

Dentro de las principales razones de presentación de reacciones pirógenicas en pacientes, aún si un suero antiofídico superó las pruebas de LAL y RPT, están relacionadas por un mecanismo que involucra la formación de complejos inmunes formados por anticuerpos heterólogos e inmunoglobulinas hacia las proteínas del antiveneno y/o porque las endotoxinas ambientales

pueden ejercer diferente pirogenicidad dependiendo de su origen, incluso cuando se ajustan a la misma concentración (es decir, la misma UE/mL) (Agudelo, 1999). Aún así, a pesar de la concentración de endotoxina que pueda haber en los sueros antiofídicos finales, la terapia de soporte en un accidente ofídico, permite la administración de soluciones como suero fisiológico, antipiréticos, que disminuyen la actividad biológica de pirogenicidad de la endotoxina presente en el suero antiofídico (Agudelo, 1999).

### **Calidad de los artículos seleccionados**

Los 7 artículos base de ésta revisión de alcance, y cuya calidad fue evaluada por medio de la herramienta ToxRTool (Schneider et al., 2009), arrojó que 4 de estos fueran categorizados como confiables sin restricciones (útiles, verificando la relevancia de éstos para el propósito previsto), mientras 3 estudios, fueron confiables con restricciones (potencialmente útiles, verificando la relevancia de éstos para el propósito previsto).

La evaluación de la confiabilidad de los datos toxicológicos es de importancia clave para la toma de decisiones. La herramienta de evaluación de confiabilidad llamada ToxRTool (Toxicological data Reliability Assessment Tool) es utilizada por científicos que se ocupan habitualmente de la evaluación de la fiabilidad de los datos toxicológicos (Schneider et al., 2009).

### **Discusión de los artículos incluidos**

Si bien, la prueba *in vivo* es la prueba más usada en la historia de la evaluación de pirógenos en sueros antiofídicos, y LAL, se puede considerar como la segunda de mayor uso, se debe procurar la realización de mas estudios que comparen directamente 2 o más pruebas de pirógenos y su uso en antivenenos ofídicos, ya que, por la naturaleza propia de éstos, se hacen necesarios mayores estudios, para evaluar su desempeño , sobretodo basados en la noción de las 3R, con miras a la reducción del uso de la experimentación animal (Busquet et al., 2020). La realización de esta revisión de alcance, permitió vislumbrar la poca evidencia relacionada existente, y se invita a la comunidad científica a la realización de más investigaciones de éste tipo. Aunque autores como Caldeira (2018), mencionan que la implementación de métodos como MAT puede llegar a ser costoso para la industria, se debe llamar la atención para que los únicos estudios que estén disponibles, no sean solamente los patrocinados por los mismos laboratorios creadores de la versión comercial de éstas pruebas de pirogenicidad, no sólo por el evidente conflicto de interés presente, sino porque los estudios disponibles se quedan cortos. Es así, como la presente revisión proporciona una visión general de la evidencia disponible hasta el momento sobre las pruebas *in vitro* MAT, LAL como posibles sustitutos de la prueba *in vivo* RPT para evaluar



pirógenos en sueros antiofídicos. Pero, sin lugar a dudas, los resultados de esta revisión de alcance, deben motivar a seguir desarrollando más estudios de pruebas de pirogenicidad alternativas a la prueba *in vivo*, y su uso en sueros antiofídicos. Esto, teniendo en cuenta el bajo número de artículos existentes y el vacío de conocimiento encontrado.

Realizar una revisión de alcance, para el desarrollo de ésta tesis, fue conveniente porque permitió identificar conceptos claves del tema, a través de una cobertura exhaustiva de la literatura existente, examinando la actividad científica, especialmente en este campo donde no es fácil observar la información disponible, al ser ésta tan excasa. También, este trabajo va a permitir la identificación rápida de la literatura y la factibilidad para futuras revisiones de alcance o investigaciones que se quieran realizar, relacionadas con pruebas para evaluar la pirogenicidad en sueros antiofídicos. Se logró también sintetizar resultados científicos encontrados, se identificaron vacíos en la literatura y se generaron recomendaciones.

## **Desafíos Técnico-Regulatorios**

La evaluación de la confiabilidad y relevancia de algunos métodos alternativos de detección de pirógenos fue desarrollada por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) y tiene aceptación internacional (Melandri et al., 2010). Dado que el MAT ha demostrado ser una alternativa adecuada a las pruebas de pirógenos, varios grupos científicos se han centrado en la validación formal de esta metodología, siguiendo las pautas proporcionadas por ECVAM (Schindler et al., 2003). En conversaciones personales que la autora tuvo con personas del gremio productor de sueros antiofídicos en Colombia, mencionaron lo complejo de realizar ensayos y en definitiva la incorporación de MAT en el proceso de calidad, debido a sus altos costos y a su difícil consecución a nivel nacional.

## **Limitaciones de éste estudio**

Por limitaciones de tiempo, la difícil situación originada por la pandemia del Covid 19, la reglamentación propia del posgrado, el acceso no disponible a todas las bases de datos (por ser éstas pagas), no fue posible incluir en esta revisión todas las bases de datos disponibles y es probable que algunas investigaciones se omitieran y afectaran los resultados obtenidos.

Por otro lado, al ser ésta una revisión de alcance, y al poderse contar solamente con 7 artículos seleccionados, que cumplían con los criterios de estudio, no se produjo una síntesis cuantitativa o análisis estadístico; y las conclusiones de éste trabajo se deben tomar como un reporte del estado actual de la evidencia.

## Conclusiones

- ✓ La prueba de LAL no puede reemplazar completamente a la RPT, ya que por definición es una prueba de detección de endotoxinas, y no reconoce otras clases de pirógenos como Gram-positivos, hongos, virus y toxoides. Por ello, la recomendación es el uso de LAL durante todo el proceso de fabricación de antivenenos, y que la liberación de los productos finales cumpla con las especificaciones tanto para el RPT como para el ensayo LAL. Aún así, LAL es la técnica *in vitro* más usada para evaluación de pirógenos en antivenenos ofídicos, a pesar de sus restricciones.
  
- ✓ Los antivenenos que se vayan a evaluar en un estudio de pirógenos, no deben contener factores que interfirieran con la reacción de LAL, para que así puedan probarse mediante éste ensayo sin ningún tipo de interferencia que genere falsos resultados. Métodos de fraccionamiento, composición y purificación intervienen directamente. Así mismo, la FDA y la USP recomiendan no trabajar con muestras puras (sin diluir), para evitar interferencias, ni trabajar al límite utilizando la máxima dilución válida.
  
- ✓ MAT parece adecuado para reemplazar la prueba de pirógenos en conejos (RPT) para la prueba de pirógenos de sueros hiperinmunes, ya que los hallazgos de los estudios mostraron que MAT es más sensible que RPT y puede detectar la pirogenicidad antes que el RPT. Esto para la seguridad de los usuarios es importante, ya que es preferible un falso positivo a un falso negativo. Aunque se necesitan más pruebas, preferiblemente sin conflictos de intereses, para una validación completa.

## **Conflictos de interés y financiación**

Esta investigación fue financiada con recursos propios. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés potencial con respecto a la investigación, autoría y/o publicación de esta investigación.

## Recomendaciones

- ✓ Realizar la prueba de LAL durante todo el proceso de fabricación de antivenenos y para la evaluación de su materia prima, y que para la liberación de los productos finales, los lotes de sueros antiofídicos cumplan con las especificaciones tanto para el RPT como para el ensayo LAL.
- ✓ Los resultados de esta revisión de alcance invitan a motivar para seguir desarrollando estudios con pruebas alternativas y su uso en sueros antiofídicos.
- ✓ Se invita a la realizar más estudios comparando 2 o más pruebas de pirogenicidad en sueros antiofídicos, sobre todo teniendo en cuenta la naturaleza propia de éstos, con miras a disminuir el uso animal.

## **A. Anexo: Revisión y clasificación de artículos incluidos en la revisión**

En el anexo se incluye la tabla de revisión y clasificación de los 7 artículos incluidos en la revisión de alcance, elaborada por la autora. Los 5 estudios iniciales incluyeron a la técnica LAL, y los 2 últimos, la prueba MAT. Todos, realizaron la comparación respectiva con la técnica RPT o prueba *in vivo*, en conejos.

Nombre del artículo	Autores	Fecha del estudio	Pruebas realizadas con guías de Farmacopeas?Cuál?	Criterios de inclusión			Prueba de LAL	Prueba de Pirógenos en Conejos (in vivo)				Idioma	País	MUESTRAS-LOTES			Muestras que hayan pasado el test comparador y fallen el test pirógenos con conejos.	Decisión final para inclusión en la Revisión sistemática		
				PRUEBA S CON TEST LAL (LIMULUS AMEOBOCITE USADO)	PRUEBA MAT (MONOCYTE ACTIVATE TEST)	COMPARACIÓN CON PRUEBA DE PIRÓGENO SEN CONEJOS		SUERO ANTIOFÍDICO EQUINO USADO	Técnica LAL usada	# Conejos usados	Características de los conejos			Dosis aplicada a conejos	Toma de temperatura	Cualquier idioma			Cualquier país	Financiamiento
ARTICULO: Assessing endotoxins in equine-derived snake antivenoms: Comparison of the USP pyrogen test and the Limulus Amoebocyte Lysate assay (LAL)	Solano et al., 2015	Oct, 2015	Pirógenos en conejos y LAL: USP 2014	Si	No	Si	Suero antiotfídico polivalente, del Instituto Clodomiro Picado	Gel-Clot	8	Conejos Raza Nueva Zelanda, peso de 2 a 3Kg. Período estabilización 30minutos	3ml/Kg	Cada 10 minutos, por 3 horas	Inglés	Costa Rica	Vicerrectoría de investigación de la Universidad de Costa Rica	Autores trabajan en la Universidad de Costa Rica. Adicionalmente, la universidad produce estos sueros.	10 Lotes	Se realiza prueba con blanco. No se reportan falsos positivos	Se reporta falso negativo, Usando el límite de endotoxina 3,5EU/mL según el cálculo de la USP 37 la muestra pasa LAL pero falla RPT. Se explica porque hay diferentes endotoxinas y unas endotoxinas pueden ser más pirógenas que otras por lo cual aunque tenga una cantidad parecida de endotoxinas en diferentes lotes, un lote puede pasar LAL pero inducir reacciones pirógenas. (FALSO NEGATIVO)	Cumple

Nombre del artículo	Autores	Fecha del estudio	Pruebas realizadas con guías de Farmacopeas? Cuál?	Criterios de inclusión			Prueba de LAL	Prueba de Pirógenos en Conejos (in vivo)				Idioma	País	MUESTRAS-LOTES			Decisión final para inclusión en la Revisión sistemática			
				PRUEBAS CON TEST LAL (LIMULUS AMEBOCITE USADO)	PRUEBA MATRYTE ACTIVATE TEST)	COMPARACIÓN CON PRUEBA DE PIRÓGENOS EN CONEJOS		SUERO ANTIOFÍDICO EQUINO USADO	Técnica LAL usada	# Conejos usados	Características de los conejos			Dosis aplicada a conejos	Toma de temperatura	Cualquier idioma		Cualquier país	Financiamiento	Conflicto de intereses
ARTICULO: Intralaboratory validation of kinetic chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay for bacterial endotoxin determination in anti-biotoxic serum	Fingola et al., 2013	Nov, 2013	LAL: Manual Cambrex, FDA y la prueba de pirógenos en conejos: USP	Si	No	Si	Suero antifídico polivalente	Cromogénico cinético cuantitativo	3	Conejos Raza Nueva Zelanda	1ml/Kg	Cada 10 minutos, por 3 horas	Inglés	Brasil	No indican	No indican	10 Lotes	Se realiza prueba de interferencias. No se reportan falsos positivos	No se reportan falsos negativos	Cumple



Nombre del artículo	Autores	Fecha del estudio	Pruebas realizadas con guías de Farmacopeas? Cuál?	Criterios de inclusión			Prueba de LAL	Prueba de Pirógenos en Conejos (in vivo)				Idioma	País	MUESTRAS-LOTES			Decisión final para inclusión en la Revisión sistemática			
				PRUEBAS CON TEST LAL (LIMULUS AMEBOCITE USADO)	PRUEBA MAT (MONOCYTE ACTIVATION TEST)	COMPARACIÓN CON PRUEBA DE PIRÓGENOS EN CONEJOS		SUERO ANTIOFÍDICO EQUINO USADO	Técnica LAL usada	# Conejos usados	Características de los conejos			Dosis aplicada a conejos	Toma de temperatura	Cualquier idioma		Cualquier país	Financiamiento	Conflicto de intereses
ARTICULO: Proposed reduction of the in vivo pyrogen test by the in vitro LAL assay for the quality control of anticrotalic, antiscorpion, antirabies and antitetanus sera	Fingola et al., 2019	2019	FDA, USP y farmacopea Brasileña	Si	No	Si	Anticrotallus serum	Cromogénico cinético cuantitativo	3	Conejos Raza Nueva Zelanda	1ml/Kg +P5:P6	Cada 10 minutos, por 3 horas	Inglés	Brasil	No indican	No indican	10 Lotes	Se realiza prueba de interferencias. No se reportan falsos positivos	No se reportan falsos negativos	Cumple

Nombre del artículo	Autores	Fecha del estudio	Pruebas realizadas con guías de Farmacopeas? Cuál?	Criterios de inclusión			Prueba de LAL	Prueba de Pirógenos en Conejos (in vivo)				Idioma	País		MUESTRAS-LOTES			Muestras que hayan pasado el test comparador y fallen el test pirógenos con conejos.	Decisión final para inclusión en la Revisión sistemática	
				PRUEBA S CON TEST LAL (LIMULUS AMEBOCITE USADO)	PRUEBA MATRYTE ACTIVATE TEST)	COMPARACIÓN CON PRUEBA DE PIRÓGENOS EN CONEJOS		SUERO ANTIOFÍDICO EQUINO USADO	Técnica LAL usada	# Conejos usados	Características de los conejos				Dosis aplicada a conejos	Toma de temperatura	Cualquier idioma			Cualquier país
TESIS: VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE ENDOTOXINA BACTERIANA (LAL) PARA O SORO ANTIBOTRÓPICO PELO MÉTODO CROMOGÊNICO CINÉTICO	Fingola, 2011	2011	LAL Y PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJOS USP 32, 2009.	Si	No	Si	Suero Antibotrópico	Cromogénico cinético cuantitativo	3	Conejos Raza Nueva Zelanda	1ml/Kg	Cada 10 minutos, por 3 horas	Portugués	Brasil	No indican	No indican	10 Lotes	Se realiza prueba de interferencias. No se reportan falsos positivos	Se realiza prueba de interferencias. No se reportan falsos negativos	Cumple

Nombre del artículo	Autores	Fecha del estudio	Pruebas realizadas con guías de Farmacopeas? Cuál?	Criterios de inclusión			Prueba de LAL	Prueba de Pirógenos en Conejos (in vivo)				Idioma	País		MUESTRAS-LOTES			Muestras que hayan pasado el test comparador y fallen el test pirógenos con conejos.	Decisión final para inclusión en la Revisión sistemática	
				PRUEBA S CON TEST LAL (LIMULUS AMEBOCITE USADO)	PRUEBA MAT (MONOCYTE ACTIVATE TEST)	COMPARACIÓN CON PRUEBA DE PIRÓGENOS EN CONEJOS		SUERO ANTIOFÍDICO EQUINO USADO	Técnica LAL usada	# Conejos usados	Características de los conejos				Dosis aplicada a conejos	Toma de temperatura	Cualquier idioma			Cualquier país
<p>TESIS:</p> <p>Valoración de endotoxinas bacterianas en sueros antiofídicos de origen equino. Optimización de métodos en el control de la calidad</p>	Agudelo, 1999	1999	LAL por USP XIII, FDA y guías de validación de LAL 1987 y 1991. PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJOS USP XXIII	Si	No	Si	8 lotes de producto terminado de Sueros del Instituto Nacional de Salud de Colombia	Gel-Clot	3	Conejos hembras, entre 1.5kg y 4kg Raza Nueva Zelanda	1ml/Kg	Cada 10 minutos, por 3 horas	Español	Colombia	No indican	No indican	Materia prima: Sustancia recién extraído de equino: 5 Lotes. 50 ml por cada lote y 8 lotes de producto terminado	Se realiza prueba de interferencias. No se reportan falsos positivos	Su trabajo permitió la ubicación de los puntos críticos en las etapas de proceso y elaboración de sueros antiofídicos. La variación de la respuesta biológica de conejos, hace que sea una prueba susceptible a circunstancias de tipo externo que inciden en los resultados, a diferencia de LAL, donde los factores son controlados, a pesar de ello la ventaja de los conejos en producto terminado es que involucra una respuesta similar a la humana. Para el control de materia prima se recomienda LAL y para la liberación de producto terminado conejos (y/o LAL)	Cumple

Nombre del artículo	Autores	Fecha del estudio	Pruebas realizadas con guías de Farmacopeas? Cuál?	Criterios de inclusión			Prueba de LAL	Prueba de Pirógenos en Conejos (in vivo)				Idioma	País	Financiamiento	MUESTRAS-LOTES			Muestras que hayan pasado el test comparador y fallen el test pirógenos con conejos.	Decisión final para inclusión en la Revisión sistemática	
				PRUEBAS CON TEST LAL (LIMULUS AMEBOCITE USADO)	PRUEBA MAT (MONOCYTE ACTIVATION TEST)	COMPARACIÓN CON PRUEBA DE PIRÓGENOS EN CONEJOS		SUERO ANTIOFÍDICO EQUINO USADO	Técnica LAL usada	# Conejos usados	Características de los conejos				Dosis aplicada a conejos	Toma de temperatura	Cualquier idioma			Cualquier país
ARTICULO: Monocyte Activation Test (MAT) as a possibility of replacement for the rabbit pyrogen test in hyperimmune sera	Agostini et al., 2018	2018	Farmacopea brasileña	No	Si	Si	Anticrotaluss serum	No uso LAL	No se utilizaron animales en este estudio; las muestras fueron probadas en conejos por el control de calidad interno del Instituto Butantan, de acuerdo con las recomendaciones de la Farmacopea Brasileña para la liberación de lotes de rutina (Brazilian Pharmacopoeia, 2010)	No se describe	No se describe	No se describe	Inglés	Brasil	Fundación Butantan y CNPq	La autora KL Buosi es especialista en Merck SA el cual es el proveedor del kit pyrodetector (MAT)	3 Lotes	No se realiza prueba de interferencias. No se descartan falsos positivos.	no se reportan falsos negativos	Cumple

Nombre del artículo	Autores	Fecha del estudio	Pruebas realizadas con guías de Farmacopeas? Cuál?	Criterios de inclusión			Prueba de LAL	Prueba de Pirógenos en Conejos (in vivo)				Idioma	País	MUESTRAS-LOTES			Muestras que hayan pasado el test comparador y fallen el test pirógenos con conejos.	Decisión final para inclusión en la Revisión sistemática		
				PRUEBAS CON TEST LAL (LIMULUS AMEBOCITE USADO)	PRUEBA MAT (MONOCYTE ACTIVATION TEST)	COMPARACIÓN CON PRUEBA DE PIRÓGENOS EN CONEJOS		SUERO ANTIOFÍDICO EQUINO USADO	Técnica LAL usada	# Conejos usados	Características de los conejos			Dosis aplicada a conejos	Toma de temperatura	Cualquier idioma			Cualquier país	Financiamiento
ARTICULO: Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT)	Caldeira, et al., 2016	2016	Farmacopea brasileña	No	Si, MAT con muestras de sangre tomada de donantes	Si	43 lotes de Antibothropic serum ABS, suero antitropicalaquéico, Anticrotalico, y suero antielapídico	No uso LAL	No se utilizó ningún animal únicamente para los fines del presente estudio, ya que se utilizaron adicionalmente durante el ensayo de rutina para la detección de contaminación pirogénica de productos inyectables. Los datos de las muestras representan los resultados de 165 conejos nueva zelanda machos, mayor o igual a 1.5 kg de peso, proporcionados por el Centro de Crianza de Animales de Laboratorio (Cecal) de la Fundación Oswaldo Cruz (Fiocruz) y utilizados para el análisis	Conejos nueva zelanda machos, con peso mayor o igual a 1.5 kg	1 ml/kg	Cada 10 minutos, por 3 horas	Inglés	Brasil	Strategic Research on Health— Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica em Saúde	Thomas Hartung, coinvestigador en este estudio, posee patentes como inventor de la prueba de pirógenos de sangre completa y el uso de sangre criopreservada, que están bajo licencia de Merck-Millipore; recibe regalías de Merck-Millipore por las ventas de la versión del kit	43 Lotes	Se reportan 11.6 casos de falsos positivos con metodo A y 16.3 casos de falsos positivos con metodo B.	no hubo falsos negativos	Cumple

## Glosario

**$\beta$  1,3 –GLUCANOS:** son polisacáridos de monómeros de D-glucosa ligados con enlaces glucosídicos. Se conoce como un grupo diverso de moléculas que pueden variar en relación a su masa molecular, solubilidad, viscosidad y configuración tridimensional. Se presenta generalmente como celulosa de las plantas, algunos hongos, setas y bacterias.

**CERTIFICADO DE ANÁLISIS:** certificado de estandarización, el cual define la activación biológica CSE en UE/ng y documenta la determinación del promedio de calibración del RSE/CSE.

**CITOQUINAS:** proteínas que regulan la función de la célula. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular.

**ENDOTOXINAS:** componente de la pared celular de las bacterias Gram Negativas que están constituidas por lípidos y polisacáridos. Se libera de la bacteria estimulando varias respuestas innatas, como secreción de citosina, expresión de moléculas de adhesión en el endotelio y la activación de la capacidad microbicida.

**ENLACES GLUCOSÍDICOS:** enlace para unir monosacáridos con el fin de formar disacáridos o polisacáridos. Se establecen en forma de éter siendo un átomo de oxígeno el que une cada pareja de unidades monosacáridos.

**FACTORES DE INHIBICIÓN:** estas sustancias son comunes y se reconocen como la disminución de la sensibilidad del reactivo. Se recomienda que todo producto sea ensayado para verificar la ausencia de inhibición.

**FARMACOPEA:** libros recopilatorios de las recetas de los productos con propiedades medicinales reales o supuestas, en lo que se incluyen elementos de su composición y modo de

preparación, editados desde el renacimiento y que más tarde serían de obligada tendencia en las oficinas de farmacia.

**IL-1 Ó INTERLEUCINA-1:** Conjunto de citocinas (proteínas que actúan como mensajeros químicos a corta distancia. Sintetizada principalmente por leucocitos.

**MÉTODO GEL-CLOT:** método en la determinación de endotoxinas, mediante la formación de un gel o coágulo insoluble, se desarrolla de manera cuantitativa o semicuantitativa teniendo como resultados binarios (+/-).

**MONÓMEROS:** molécula de pequeña masa molecular que unido a otros monómeros (por enlaces químicos usualmente covalentes), forman macromoléculas como los polímeros.

**PIRÓGENOS:** viene de dos términos griegos: “pyro” quiere decir fuego o “calor” y “gen”, que quiere decir producción “de” por lo tanto un pirógeno es algo que genera fiebre.

**POLISACÁRIDOS:** biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos, encontrándose en los glucosidos. Son compuestos orgánicos resultantes del metabolismo vegetal primario, contiene en su estructura una función aldehído o cetona y el resto de los carbonos hidroxilados (OH): por lo tanto, son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas. Cumple diversas funciones en la mayoría en reservas energéticas y estructurales.

**REACTIVO LAL:** (*Limulus Amebocyte Lisado polyphemus*) reactivo de origen biológico, obtenido por la sangre del cangrejo de herradura; descubierto en 1956 por el doctor Frederick Bang.

**SUERO ANTIOFÍDICO:** producto biológico en el tratamiento de picadura o mordeduras de serpientes venenosas. La antitoxina del veneno de serpiente debe cumplir cuidadosamente las normas de la Farmacopea y la (OMH) organización mundial de la salud.

**VALIDACIÓN:** muestra un enfoque con las pruebas documentadas donde se demuestra el método analítico que es lo suficientemente confiable para producir resultados previstos dentro de los intervalos definidos.

## Bibliografía

1. Abd-Elsalam, M.A., Abdoon, N., Al-Ahaidib, M.S. (2011). ¿What is the optimum concentration of m-cresol in antivenoms? *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12-22.
2. Agudelo, C. M. (1999). Trabajo de grado. Valoración de endotoxinas bacterianas en suero antiofídico de origen equino. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia
3. Agudelo, C.M., Arias, J. (2001). Detección de Pirógenos. *Laboratorio Actual*, 17-24.
4. Angulo, Y., Estrada, R., Gutierrez, J.M. (1997). Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. *Toxicon* 35, 81-90.
5. Araceli, D., Cheroni, P. (1994). Producción de suero antiofídico en Uruguay. *Rev Med Uruguay*, 147-154.
6. Araujo, H. P., Bourguignon, S.C., Boller, M.A., Dias A.A., Lucas, E.P., Santos, I.C., Delgado I.F. (2008). Potency evaluation of antivenoms in Brazil: the national control laboratory experience between 2000 and 2006. *Toxicon* 51 (4), 502-514.
7. Ayerbe S, Rodríguez J. R. (2008). Accidentes por animales venenosos y plantas tóxicas, Accidente ofídico Crotálico. En: Correa L. F, Berdejo J. P, Mora V. H, Sánchez D. M, Gutiérrez M, editores. *Guías para el manejo de Urgencias Toxicológicas Grupo de Atención de Emergencias y Desastres*. Bogotá, Colombia: Imprenta Nacional de Colombia; p. 284-6.
8. Barer, W. (2019). Suero AntiCoral. Obtenido de [www.icp.ucr.ac.cr/recursos/docs/sueros/INSERTO\\_ACLQ.pdf](http://www.icp.ucr.ac.cr/recursos/docs/sueros/INSERTO_ACLQ.pdf).
9. Bart., L. (2012). Venenos de serpiente: de la investigación al tratamiento. *Acta Médica Costarricense*, 86-96.
10. Belmonte, S. M. (2007). Determinación de la dosis letal media (DL50), de cinco especies de género *Micrurus* en estado de cautiverio en Nilo-Cundinamarca (Colombia). Florencia, Caquetá, Colombia: Universidad de la Amazonía.



11. Boulant, J. A. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clinical Infectious Diseases*, 31, S157-S161.
12. Busquet, F., Kleensang, A., Rovida, C., Herrmann, K., Leist, M., & Hartung, T. (2020). New European Union Statistics on Laboratory Animal Use. 37(2), 167–186. <https://doi.org/10.14573/altex.2003241>
13. Cadle, J. E. (1992). On Colombian Snakes. *Herpetológica*, 48, 134-143.
14. Camey, K. U., Velarde, D.T., Sánchez, E.F. (2002). Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon* 40, 501-509.
15. Caicedo-Portilla, J. R. (2011). Dimorfismo sexual y variación geográfica de la serpiente ciega *Typhlops Reticulatus* (Scolophoridae: Typhlopidae) y distribución de otras especies del género en Colombia. *Zoología-Morfología*, 221:234.
16. Caldeira, C., Nogueira, C. B., Dos Santos, P., Blini, E. M., Antunes, C., Couto, R. S., Spoladore, J., Gutemberg, A., Presgrave, O. A., Fernández, I. Alternative methods for the detection of pyrogens in products and environment subject to public health surveillance: advances and perspectives in Brazil based on the international recognition of the Monocyte Activation Test. *Vigil. sanit. debate* 2018;6(1):137-149.
17. Caldeira, C. (2018). “Alternative Methods for the evaluation of Pyrogens. Monocyte Activation Test– MAT” (p. 49). p. 49. Buenos Aires: Colama 2018.
18. Caldeira, C., Augusto, O., Presgrave, F., Hartung, T., Maria, A., Moraes, L. De, & Fernandes, I. (2016). Toxicology *in vitro* Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). 32, 70–75.
19. Camey, K., Velarde, D., & Sanchez, E. (2002). Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon*, 40(5), 501–509.
20. Campbell J.A, Lamar W.W. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere* (Vol. I). Cornell: Cornell University Press ed: Cornell University Press.
21. Caro, N., & Cruz, Y.M. (2006). Validación de las pruebas de esterilidad por la técnica de filtración de membrana y endotoxinas por el método de LAL en 3 productos farmacéuticos. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
22. Caron E.J., Manock S.R., Maudlin J., Koleski J., Theakston R.D.G., Warrell D.A., et al. (2009). Apparent marked reduction in early antivenom reactions compared to historical controls: Was it prophylaxis or method of administration? *Toxicon*, 779-83.

23. Carrillo, Cristian; Arias, Janeth del Carmen, Ospina, Jair; Aldana, Doris; Arias, Jaime; Echeverri Christopher. (Enero de 2006). Valoración de endotoxinas bacterianas en raditidina y penicilina G sódica inyectable mediante la prueba de *Amebocito Limulus*. Revista de la Facultad de Ciencias Universitas Scientarium(1), 15-28.
24. Castillo, C.M. (2015). Desarrollo de un antiveneno micrúrico polivalente en el Instituto Nacional de Salud. Memorias: III Congreso Nacional de Investigación e Innovación en Salud Pública (pág. 41). Bogotá: Instituto Nacional de Salud.
25. Castrillón-Estrada, D. F., Vélez, J. G. A., Hernández-Ruiz, E. A., Marina, L., & Palacio, A. (2007). Envenenamiento ofídico Snake poisoning. 23(1), 96–111.
26. Cavalcante L.G, Ponce-Soto L. A, Marangoni S, Gallacci M. (2015). Neuromuscular effects of venoms and crotoxin-like proteins from *Crotalus durissus ruruima* and *Crotalus durissus cumanensis*. Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology. 96:46-9.
27. Chang K.P., Lai C.S., Lin S.D. (2007). Management of poisonous snake bites in Southern. Kaohsiung Journal Medical Sciences, 511-517.
28. Chippaux J.P., Goyffon M. (1998). Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon, 36(6), 823-46.
29. Dawson, M. (2005). LAL Update (Vol. 22).
30. De Agostini, C., Lais, K., Fungaro, V., & Quintilio, W. (2018). Monocyte Activation Test (MAT) as a possibility of replacement for the rabbit pyrogen test in hyperimmune sera. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 1–6. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000217530>
31. Escalante T., Rucavado A., Fox J.W., Gutiérrez J.M. (2011). Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. Journal of proteomics. 74(9):1781-94.
32. Española, R. F. (Enero de 2008). Agencia Española de Medicamentos y productos Sanitarios. Obtenido de <http://www.ugr.es/~adolfin/a/asignaturas/TF3/pirogenos.pdf>
33. Espino-Solis, G.P., Riaño-Umbarila L., Becerril B., Possani L.D. (2009). Antidotes against venomous animals: State. Journal of Proteomics, 72(2), 183-199.
34. Fernández, M., & Rodríguez, M. R. (1995). Contaminación del líquido de diálisis por endotoxinas bacterianas por un filtro como medida preventiva. Tenerife: Hospital de Nuestra Señora de la Candelaria.
35. Ferreira Cardoso D., Yamaguchi, I.K., Maura Da Silva, A.M. (2003). Produção de Soros Antitoxinas e Perspectivas. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica, 376-379.

36. Fujifilm. (2015). Fujifilm Pyrostar. Obtenido de <https://www.wakopyrostar.com/blog-es/post/comparando-el-metodo-de-lal-con-el-ensayo-de-pirogenos-en-conejos/>
37. Fukuda, T., Iwaki, M., Hong, S.H., Oh, H.J., Wei, Z., Morokuma, K., Ohkuma, K., Dianliang, L., Arakawa, Y., Takahashi, M. (2006). Standarization of regional reference for mamushi (*Gloydius blomhoffii*) antivenom in Japan, Korea, and China. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59 (1), 20-24.
38. García, M., Monge, M., León, G., Lizano S., Segura, E., Solano G., Rojas G., Gutierrez J.M. (2002). Effect of preservatives on IgG aggregation, complement-activating effect and hypotensive activity of horse polyvalent antivenom used in snakebite envenomation. *Biologicals* 30, 143-151.
39. Gómez, J.P., Gómez C., Gómez, M.L. (2017). Sueros antiofídicos en Colombia: Análisis de la producción, abastecimiento y recomendaciones para el mejoramiento de la red de producción. *Revista Biosalud*, 16, 96-116.
40. Gómez, J.P. (2011). Accidente por animales ponzoñosos y venenosos: su impacto en la salud ocupacional en Colombia. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 29: 419-431.
41. Gómez, C. (2015). Seminario de accidente ofídico en Colombia. Bogotá, Colombia.
42. González, A.S., Gutiérrez, E.S. (1994). Validación de la prueba de *Lisado de Amebocitos de Limulus* (LAL) para la detección de endotoxinas bacterianas en soluciones parenterales. Universidad de Guadalajara. Tomado de: [http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3528/Gonzalez\\_Sanchez\\_Agustin.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3528/Gonzalez_Sanchez_Agustin.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
43. Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David M.N. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177 751e66.
44. Guidolin R. G, Marcelino R. M, Gondo H. H, Morais J. F, Ferreira R. A. (2010). Polyvalent horse F(Ab`)<sub>2</sub> snake antivenom: Development of process to produce polyvalent horse F(Ab`)<sub>2</sub> antibodies anti-african snake venom. *African Journal of Biotechnology.* 9(16):2446-55.
45. Gutiérrez JM, Lomonte B, Rojas G, Gené JA, Chaves F, Estrada R, et al. (1988). El suero antiofídico polivalente. *Rev. Cost. Cienc. Méd*, 9(2), 155-69.
46. Gutiérrez J. M. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical.* 50:377-94.
47. Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell DA. (2010). Snakebite envenoming from a global perspective: *Toxicon*, 1224-35.

48. Gutiérrez JM, G. León, B. Lomonte, Y. Angulo. (2011). Antivenenos para envenenamientos por mordedura de serpiente. *Inflamm. Objetivos de medicamentos para alergias*, 10 369 – 380.
49. Gutierrez J. M, Leon G, Burnouf T. (2011). Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*. 39(3):129-42.
50. Gutiérrez, J.M., Solano G., Pla, D., Herrera M., Segura A., Villalta M., Vargas M., Sanz L., Lomonte, B., Calvete J.J., León G. (2013). Assessing the preclinical efficacy of antivenoms: from the lethality neutralization assay to antivenomics. *Toxicon* 69, 168-179.
51. Gutiérrez, J.M., Solano, G., Pla D., Herrera M., Segura A., Vargas M., Villalta, M., Sanchez A., Sanz L., Lomonte B., León G., Calvete J.J. (2017). Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: state-of-the-art and challenges ahead. *Toxins (Basel)* 9 (5) pii: E163.
52. Guyton A., & Hall, J. (2001). *Tratado de fisiología médica (Decima ed.)*. Mc Graw Hill Interamericana.
53. Hartung, T., & Wendel, A. (1995). Detection of Pyrogens using human whole blood. *Altex*.
54. Hartung, Thomas. (2002). Comparison and Validation of Novel Pyrogen Tests Based on the Human Fever Reaction. 21020, 49–51.
55. Hartung, Thomas. (2021). Pyrogen Testing Revisited on Occasion of the 25th Anniversary of the Whole Blood Monocyte Activation Test. 38(1), 3–19. <https://doi.org/10.14573/altex.2101051>
56. Herrera, M., Meneses, F., Gutiérrez J.M., León G. (2009). Development and validation of a reverse phase HPLC method for the determination of caprilic acid in formulations of therapeutic immunoglobulins and its application to antivenom production. *Biologicals* 37 (4), 230-234.
57. Herrera, M. Tattini, V., Pitombo R., gutiérrez J.M., Borgognoni, C., Vega-Baudrit, J., Solera, F., Cerdas M., Segura A. (2014). Freeze-dried snake antivenoms formulated with sorbitol, sucrose or mannitol: comparison of their stability in an accelerated test. *Toxicon* 90, 56-63.
58. Holvey D., & Talbott, J. (1974). *Manual Merck de diagnóstico y terapéutica*. Quinta. Merck Sharp & Dohme Research Laboratorios.
59. ICA. (2001). Obtenido de [http://www.vertic.org/media/National%20Legislation/Colombia/CO\\_Resolucion\\_2935\\_de\\_2001.pdf](http://www.vertic.org/media/National%20Legislation/Colombia/CO_Resolucion_2935_de_2001.pdf)

60. ICCVAM. (2008). ICCVAM Background Review Document: Validation Status of Five *In Vitro* Test Methods Proposed for Assessing Potential Pyrogenicity of Pharmaceuticals and Other Products. (08).
61. Instituto Nacional de Salud. (2017). Vigilancia y análisis del riesgo en salud pública, protocolo de vigilancia en salud pública: accidente ofídico. Versión 3. En: [http://observatoriosaludcauca.gov.co/wp-content/uploads/2019/11/PRO-Accidente-ofidico\\_.pdf](http://observatoriosaludcauca.gov.co/wp-content/uploads/2019/11/PRO-Accidente-ofidico_.pdf)
62. Iriarte, M. J., Ugarte C. J., & Salazar, L. (2001). Utilidad de la determinación de las endotoxinas bacterianas en diferentes ambientes laborales como indicador de riesgo por agentes biológicos. *Mapfre Medicina*, 234-240.
63. Jesupret, C., Baumann, K., Jackson, T.N., Ali, S.A., Yang, D.D., Greisman, L., Kern, L., Steuten, J., Jouiaei, M., Casewell, N.R., Undheim, E.A., Koludarov, I., Debono, J., Low, D.H., Rossi. (2014). Vintage venoms: proteomic and pharmacological stability of snake venoms stored for up to eight decades. *J. Proteomics* 105, 285-294.
64. Lacoste, R.J., Venable, S.H., Stone J.C. (1959). Modified 4-aminoantipyrine colorimetric method for phenols. Application to an acrylic monomer. *Anal. Chem.* 31, 1246-1249.
65. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
66. León G., Vargas M., Segura A., Herrera M., Villalta M., Sanchez A., Solano G., Gomez A., Sanchez M., Estrada R., Gutierrez J M. (2018). Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon* 151, 63-73.
67. Lifshitz, A. (2007). Fiebre y otras formas de elevación térmica. *Revista de investigación clínica*, 59(2), 130-138.
68. Litwin S., Isabettini A. O., Calderón L., Varni L.M. (2014). Optimización en la recuperación de inmunoglobulinas, como molécula entera y fragmento F(ab')<sub>2</sub>, en la producción de antivenenos. *Acta toxicol. Argent.* 22(2):82-9.
69. Lomonte B., Gutierrez J. M. (2011). Phospholipases A2 from viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? *Acta chimica Slovenica.* 58(4):647-59.
70. López-Casas, J. G., Olivera-Martínez, E., & Rey-Benito, G. J. (2010). *Manual de Gestión Integral de Residuos*. Bogotá: República de Colombia, Instituto nacional de salud. Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/manual-gestion-integral-residuos.pdf>

71. Lynch, J. D. (2012). El contexto de las serpientes de Colombia con un análisis de las amenazas en contra de su conservación. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 36(140), 39.
72. Madigan M., Martinko J., Parker J. (1999). *Biología de los microorganismos* (Octava ed.). Madrid, España: Prentice Hall.
73. Marcus S., J.R. Nelson. (1977). Test alternative to the rabbit bioassay for pyrogens. *Dev. Biol. Stand.*, 45-55.
74. Morales, R. P. (2004). Ensayo del lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL). *Rev Cubana Farm V.* 38, 36.
75. Morita T., Tanaka S., Nakamura T., Iwanaga S. (1981). Una nueva vía de coagulación mediada por (1-3) - $\beta$ - d -glucano que se encuentra en los amebocitos del *limulus*. *FEBS Lett*, 129. 318-321.
76. Negherbon, J. P., Hartung, T., & Gomes, G. (2021). Standardized pyrogen testing of medical products with the bacterial endotoxin test (BET) as a substitute for rabbit Pyrogen testing (RPT): A scoping review. 74 (December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105160>
77. Núñez Rangel V., Fernández Culma M., Rey-Suárez P., Pereañez J.A. (2012). Development of a sensitive enzyme. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 173-9.
78. Ochiai, M., Yamamoto, A., Naito, S., Maeyama, J., Masumi, A., Hamaguchi, I., Yamaguchi, K. (2010). Biologicals Applicability of bacterial endotoxins test to various blood products by the use of endotoxin-specific lysates. *Biologicals*, 38(6), 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2010.07.003>
79. Otero R, Callejas ME, Gutiérrez J, Lotero GJ, Rodríguez O, Villa NH, et al. (2001). Necesidades reales de antivenenos en Colombia. Características de los productos y del mercado. *Revista Epidemiológica de Antioquia*, 49-59.
80. Otero R., Gutiérrez J.M., Estrada R, Osorio R.G., Del-Valle G., Valderrama R., et al. (1997). Neutralizing capacity of a new monovalent anti-Bothrops atrox antivenom: comparison with two commercial antivenoms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 375-379.
81. Otero, R. (1994). *Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico*. 81. Medellín, Antioquia: Universidad de Antioquia.
82. Otero-Patino R. (2009). Epidemiological, clinical, and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*, 998-1011.

83. Otero R, Núñez V., Barona J., Díaz A., Saldarriaga M. (2002). Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. IATREIA.15(1).
84. Padilla A., Bon C., Burnouf T., Gutiérrez J.M., Ratanabanangkoon K. (2010). Collection and control of animal plasma for fractionation. En: WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenoms Immunoglobulins [Internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, [citado: 10 de enero de 2022]; p.39-43. Disponible en: [http://www.who.int/bloodproducts/snake\\_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1](http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf?ua=1).
85. Pérez-Santos Carles, Moreno Andrew. (1988). Museo Regionale di Scienze Naturali, Monographie VI. Ofidios de Colombia. Torino, Italia.
86. Perdomo-Morales, R. (2004). Ensayo del *Lisado de Amebocitos del Limulus* (LAL). (January).
87. Peña L. M. (2012). Accidente Ofídico Bothrópico y Lachesico. En: Peña L. M, Zuluaga A. F, editores. Protocolos de manejo del paciente intoxicado. Medellín, Colombia: Editorial Artes y Letras S.A.S; p. 226-33.
88. Pineda D., Rengifo J. (2002). Accidentes por animales venenosos: accidente ofídico. Bogotá: Instituto Nacional de Salud.
89. Pino, A. (1994). Producción de suero antiofídico en Uruguay. 10, 147–154.
90. PROBIOL, L. (2015). Suero Polivalente Antiviperido “Ficha Técnica”. Obtenido de Probiol: [www.probiol.com](http://www.probiol.com)
91. Ramón-Romero F., Farías JM. (2014). La fiebre. Revista de la Facultad de Medicina, 57(4), 20-24.
92. Rey-Suárez P, Núñez V, Fernández J, Lomonte B. (2016). Integrative characterization of the venom of the coral snake *Micrurus dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, toxicity, and cross-neutralization by antivenom. Journal of Proteomics, 262-273.
93. Rodríguez-Vargas, A. (2012). Comportamiento general de los accidentes provocados por animales venenosos en Colombia, 2006-2010. Rev Salud Pública, 1001-1009.
94. Rojas G, Jiménez J, Gutiérrez J. M. (1994). Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. Toxicon: official journal of the International Society of Toxicology. 32(3):351-63.

95. Sánchez-Corredor, N. (1994). Estandarización del método del *Lisado de Amebocitos de Limulus polyphemus* para la detección y cuantificación de endotoxinas bacterianas en algunas soluciones parenterales y estudio comparativo con el ensayo de pirógenos en conejos. 29-33. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
96. Sarmiento K., Torres I., Guerra M., Ríos C., Zapata C., Suárez F. (2018). Epidemiological characterization of ophidian accidents in a Colombian tertiary referral hospital. Retrospective study 2004-2014. *Revista de la Facultad de Medicina*, 66: 153-158.
97. Schindler, S., S.V, A., Daneshian, M., & Hartung, T. (2009). Development, Validation and Applications of the Monocyte Activation Test for Pyrogens Based on Human Whole Blood. (January).
98. Schindler, Stefanie, Adrian, B., Thammy, C., & Hartung, T. (2003). Comparison of the reactivity of human and rabbit blood towards pyrogenic stimuli. (February 2003).
99. Schneider, K., Schwarz, M., Burkholder, I., Kopp-schneider, A., Edler, L., Kinsner-Ovaskainen, A., Hoffmann, S. (2009). "ToxRTool", a new tool to assess the reliability of toxicological data. 189, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.013>
100. Segura, A., León G., Su, C.Y., Gutiérrez J.M., Burnouf T. (2009). Assessment of the impact of solvent/detergent treatment on the quality and potency of a whole IgG equine antivenom. *Biologicals* 37, 306-312.
101. Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Gutiérrez J.M., León G. (2012). Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. *Biologicals* 41, 93-97.
102. Solano G., Gómez A., León G. (2015). Assessing endotoxins in equine-derived snake antivenoms: Comparison of the USP pyrogen test and the Limulus Amoebocyte Lysate assay (LAL). *Toxicon* 105. 13-18.
103. Solis, J. (2004). Validación de la prueba de endotoxinas bacterianas LAL (Limulus Amebocyte Lysate) por el método de Gel-Clot de Clindamicina 600mg inyectable. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
104. Suárez R. (2018). Colombia y el grave riesgo de mordeduras de serpiente, según estudio. Artículo de Diario el Tiempo. Publicado el 9 de septiembre de 2018. Tomado de: <https://www.eltiempo.com/salud/datos-sobre-mordeduras-de-serpiente-en-colombia-265600>
105. Sucup, C. (2009). Activación de un sistema de filtrado para la purificación de agua utilizada en la elaboración de soluciones masivas e implementación de un control para el mantenimiento. Guatemala: Universidad de San Carlos.



106. Triana P. A. (2017). Determinación de los efectos de la temperatura de almacenamiento sobre el título de anticuerpos y capacidad neutralizante en las diferentes presentaciones comerciales de antivenenos polivalentes producidos en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. En: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/62952/52996364.2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
107. USP (United States Pharmacopeia). (2014a). <71> Sterility test. In: USP 37/NF 32. U.S. Pharmacopeial convention, Rockville, pp. 84 (translated to Spanish).
108. USP (United States Pharmacopeia). (2014b). Pyrogen test. In: USP 37/NF 32. U.S. Pharmacopeial convention, Rockville, pp. 166 (translated to Spanish).
109. USP (United States Pharmacopeia). (2014c). Bacterial endotoxin test. In: USP 37/NF 32. U.S. Pharmacopeial convention, Rockville, pp. 111 (translated to Spanish).
110. USP (United States Pharmacopeia). (2014d). NaCl. In: USP 37/NF 32. U.S. Pharmacopeial convention, Rockville, pp. 5279 (translated to Spanish).
111. Vargas M, Segura Á, Villalta M, Herrera M, Gutiérrez J. M. (2015). Purification of equine whole IgG snake antivenom by using an aqueous two phase system as a primary purification step. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*. 43(1):37-46.
112. Waghmare AB, Salvi NC, Deopurkar RL, Shenoy PA, Sonpetkar JM. (2014). Evaluation of health status of horses immunized with snake venom and montanide adjuvants, IMS 3012 (nanoparticle), ISA 206. *Toxicon*, 83-92.
113. Walteros D, Paredes A, León L. J. (2015). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública, Accidente ofídico. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Salud, Grupo de Enfermedades Transmisibles Equipo de Zoonosis; p. 1-28.
114. Warrell, D. A. (2012). Venomous Bites, Stings, and Poisoning. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 207-23.
115. WHO. (14 de 10 de 2007). International statistical classification of diseases and related health. Obtenido de WHO: ([http://www.who.int/medicines/publications/08\\_ENGLISH\\_indexFINAL\\_EML15.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/08_ENGLISH_indexFINAL_EML15.pdf))
116. WHO. (2021). Snakebite envenoming. Obtenido de WHO: (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>).
117. Williams D.; Gutiérrez J.M.; Harrison R.; Warrell D.A.; White J.; Winkel K.D; (2010). The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet*, 89-91.

118. Yu-Lai, J., Speers, A., Allant, P., & Stewart, R. (2005). Los beta-glucanos de la cebada y la degradación durante el malteado y la fabricación de la cerveza. *Cerveza y Malta*, 23-35.
119. Zambrano, A. M. (2012). *Accidente ofídico como evento de interés en salud pública en Colombia: aportes al diseño de estrategias de gestión*. Bogotá: Colombia: Universidad Nacional de Colombia.