

Aplicação do fator C recombinante para testes de endotoxinas bacterianas em produtos biológicos

Caroline Perez – 20/02/2025



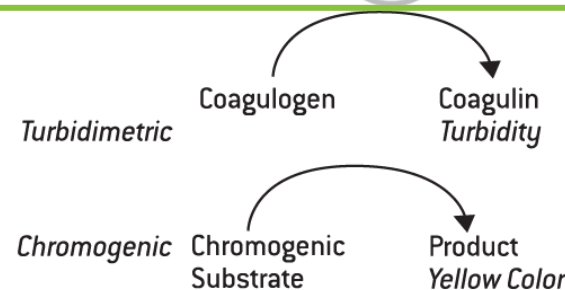
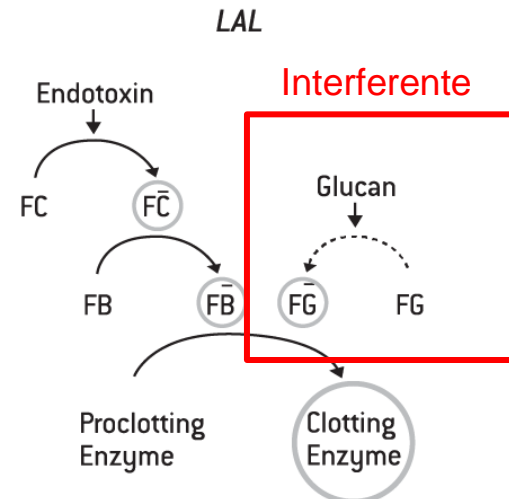
ENSAIO TRADICIONAL

LAL (Lisado de Amebócito de Limulus):

- Padrão ouro para testagem de endotoxina;
- Reagente obtido a partir do sangue do caranguejo ferradura, que promove disparo de cascata enzimática na presença de endotoxina:



Opções de detecção:



USO DO CARANGUEJO FERRADURA



- **Cerca de 30 %** dos animais morrem após a sangria, mesmo sendo devolvidos à natureza.^[1]
- **90 %** da espécie foi dizimada nos últimos **15 anos**.^[2]
- A eliminação do uso do caranguejo está alinhada ao princípio dos **3R's** (Replacement, Reduction and Refinement).^[3]

[1] Smith DR, Newhard JJ, McGowan CP, Butler A. The long-term effect of bleeding for *Limulus* Amebocyte Lysate on annual survival and recapture of tagged horseshoe crabs. *Front Mar Sci*. 2020;7. doi: <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.607668>

[2] The IUCN Red List of Threatened Species. <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 18/06/24.

[3] Russel WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen & Co. Limited. 1959.

ASPECTOS REGULATÓRIOS


HUMANE SOCIETY INTERNATIONAL LATIN AMERICA

Our Work How You Can Help About Us Country | Language ▾ DONATE

June 20, 2023

HSI/Korea welcomes regulatory uptake of horseshoe crab test replacement method

Humane Society International / South Korea



SEOUL—Animal protection organization Humane Society International Korea (HSI/Korea) welcomes the Ministry of Food and Drug Safety's announcement of a phaseout of the use of horseshoe crab blood for toxicity tests. Alternatives are available, and a synthetic recombinant Factor C (rFC) will be used instead of wild-caught horseshoe crab blood.

The horseshoe crab is a blue-blooded marine species, more ancient than dinosaurs. Now, its population having dwindled, it is endangered according to the International Union for Conservation of Nature. Capture and bleeding for

- Substituição progressiva do LAL tradicional pelo reagente recombinante já iniciada na Coreia do Sul, por determinação do Ministério da Segurança de Alimentos e Medicamentos.

| Draft <86> Chapter | 2.6.32. Chapter | <G4-4-180> Chapter |
|---|---|--|
| <p>USP</p> <p>Unless specified in an individual monograph or General Notices, the tests in this chapter are considered alternative tests and users must meet the requirements in <i>General Notices</i> 6.30.</p> | <p>European Pharmacopeia</p> <p>The replacement of an LAL-based method prescribed in a monograph by an rFC-based method is considered as the use of an alternative method as described in the Ph. Eur. General Notices.</p> | <p>Japanese Pharmacopeia</p> <p><G4-4-180> describes procedures and consideration in measurement when using recombinant protein-reagents for endotoxin assay as alternative methods, in addition to lysate reagents and test methods in Bacterial Endotoxins Test.</p> |

Current Horseshoe Crab Harvesting Practices Cannot Support Global Demand for TAL/LAL: The Pharmaceutical and Medical Device Industries' Role in the Sustainability of Horseshoe Crabs

Chapter

pp 475–482 | [Cite this chapter](#)

Abstract

Globally, injectable pharmaceuticals and parenterals, implantable medical devices and similar therapeutic products are safety tested for endotoxin contamination using indicator reagents derived from the blood of horseshoe crabs. *Tachypleus* and *Limulus* Amoebocyte Lysate (TAL and LAL, respectively) are used in quality control laboratories for testing of raw materials, intermediates and final products to protect public health. As the demand for human and animal drugs and devices increases, so does the demand for TAL and LAL. In the United States, the harvesting of horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*) is regulated and monitored. Harvesting limits have been exceeded in recent years and may lead to enforcement of harvesting limits to the American LAL industry. Throughout most of Asia, the harvesting of horseshoe crabs is poorly regulated and unmonitored. All indicators point to a declining population. If the *Tachypleus* population cannot support TAL production for the Asia and Pacific pharmaceutical and medical device industries, companies will entirely depend on LAL for testing. The already limited LAL supply is not sufficient to support this increased global demand and will likely result in increased cost and constrain the availability of pharmaceutical and medical device products. As consumers of horseshoe

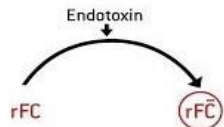
Gauvry, G. (2015). Current Horseshoe Crab Harvesting Practices Cannot Support Global Demand for TAL/LAL: The Pharmaceutical and Medical Device Industries' Role in the Sustainability of Horseshoe Crabs. In: Carmichael, R., Botton, M., Shin, P., Cheung, S. (eds) Changing Global Perspectives on Horseshoe Crab Biology, Conservation and Management. Springer, Cham.

ABORDAGENS RECOMBINANTES

ENDOZYME® II GO - bioMerieux



Recombinant Factor C



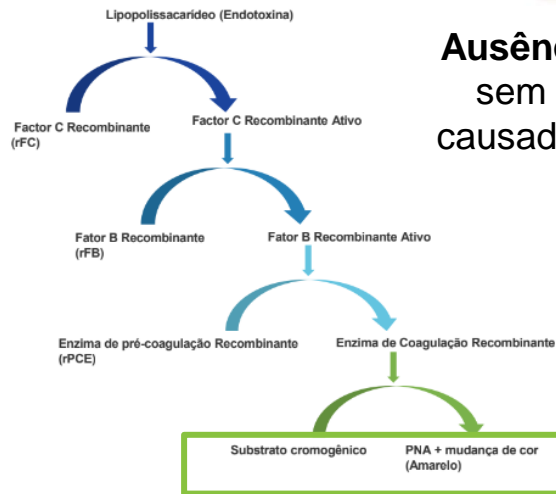
Ausência do Fator G:
sem interferências
causadas por glucanos

Substrate

Detectable
Signal

Deteção por fluorescência

Endosafe Trillium (rCR) – Charles River



Ausência do Fator G:
sem interferências
causadas por glucanos

A multi-channel pipette, with the number '300' visible on its body, is shown dispensing liquid into a 96-well plate. The pipette has multiple tips, each positioned over a well in the plate. The background is a soft, out-of-focus laboratory setting with a blue and green color gradient.

**Testes preliminares
ENDOZYME® II GO - bioMerieux**

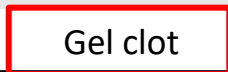
ENDOZYME® II GO - bioMérieux



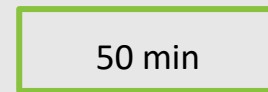
| Amostras testadas | Método tradicional | Tempo de análise do método tradicional | Tempo de análise da abordagem recombinante |
|---|-------------------------|--|--|
| Monovalente de vírus influenza ultra concentrado a granel | Cinético turbidimétrico | 2 h – 2 h 30 min | |
| Vacina influenza trivalente (fragmentada e inativada) | Cinético turbidimétrico | 2 h – 2 h 30 min | |
| Soro antibotrópico (pentavalente) concentrado a granel | Pirogênio in vivo | ≅ 6 h | 50 min |
| Água para injetáveis | Gel clot | 2 h | |



Interferência da matriz do produto a granel no MAT



Ensaio visual e semi-quantitativo



- Placa **pré-preenchida** com a curva analítica e controles positivos.
- Redução do tempo de leitura de **60 para 20 min** em relação ao método tradicional.

ENDOZYME® II GO - bioMerieux



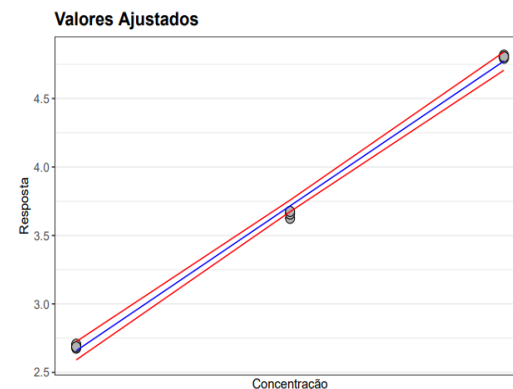
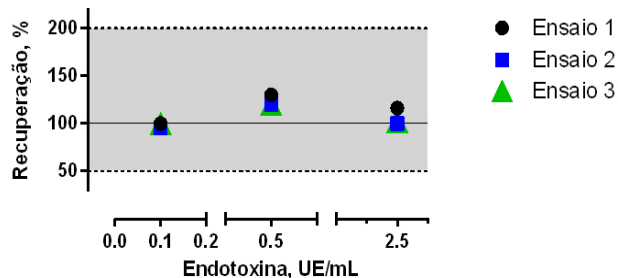
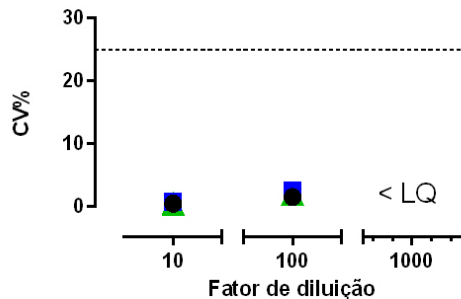
| Amostras testadas | Concentração de endotoxina (LAL) UE/mL | Concentração de endotoxina (rFC) UE/mL | Especificação |
|--|--|--|-------------------------------|
| Monovalente de vírus influenza ultra concentrado a granel | < 0,5000 | 10 a 12 | ≤ 145 EU/mL |
| Vacina influenza trivalente (fragmentada e inativada) | < 0,10 (< 0,05 UE/DIH) | 5 a 7 | < 200 UE/mL (< 100 UE/DIH) |
| Soro antibotrópico (pentavalente) concentrado a granel ^{*(1)} | ----- | < 0,50 | < 1,75 UE/mL |
| Água para injetáveis | < 0,125 | < 0,05 | < 0,25 UE/mL |

^{*(1)} Analisado pelo método de pirogênio in vivo – Especificação: Nenhum dos 3 coelhos deve apresentar aumento da temperatura ≥ 0,5 °C e em caso de reteste no máximo 3 dos 8 coelhos podem apresentar aumento de temperatura ≥ 0,5 °C, e a soma dos aumentos individuais dos 8 coelhos não pode exceder a 3,3 °C

ENDOZYME® II GO - bioMerieux



- **Método validável:** seletivo, preciso, exato e linear.



$r = 0,9985$

A multi-channel pipette is shown dispensing liquid into a 96-well plate. The pipette is white and has the number '300' printed on it. The plate is clear and contains several wells with liquid. The background is a gradient of green and blue.

**Endosafe Trillium (rCR)
Charles River**

Endosafe Trillium (rCR) – Charles River

- **Apresentações:**

Reagente para preparo de placa de 96 poços



Capacidade de leitura de até 14 amostras em 60 minutos.

Cartucho



Capacidade de leitura de:

- 5 cartuchos simultaneamente no equipamento MCS.
- 1 cartucho no equipamento PTS (portátil).

Tempo de leitura: 15 minutos

Endosafe Trillium (rCR) – Charles River



| Amostras testadas | Método tradicional | Tempo de análise do método tradicional | Tempo de análise do cartucho recombinante |
|---|-------------------------|--|---|
| Monovalente de vírus influenza ultra concentrado a granel | Cinético turbidimétrico | 2 h – 2 h 30 min | 40 min |
| Citrato trissódico | Cinético cromogênico | 40 minutos | |
| Solução estabilizante da formulação (PVD) | Cinético cromogênico | 40 minutos | |
| Soro antitetânico concentrado a granel | Pirogênio in vivo | ≅ 6 h | |



Interferência da matriz do produto a granel no MAT

Cinético cromogênico: LAL vs rCR
A execução do método é **idêntica**
Cartucho pré-preenchido com controle positivo e informações da curva do lote

A multi-channel pipette is shown dispensing liquid into a 96-well plate. The pipette has a volume of 300 µl. The background is a gradient of green and blue. The text is overlaid on the image.

**Testes preliminares com
cartucho *Endosafe Trillium (rCR)***

Endosafe Trillium (rCR) – Charles River



| Amostras testadas | Concentração de endotoxina LAL | Concentração de endotoxina rCR | Especificação | Recuperação controle positivo LAL, % | Recuperação controle positivo rCR, % |
|---|--------------------------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Monovalente de vírus influenza ultra concentrado a granel | < 0,1 UE/mL | < 0,1 UE/mL | ≤ 145 EU/mL | 116 – 139 | 153 – 172 |
| Citrato trissódico | < 0,1 UE/g | < 0,1 UE/g | ≤ 2,5 UE/g | 70 – 129 | 57 – 68 |
| Solução estabilizante da formulação (PVD) | < 2 UE/mL | < 2 UE/mL | ≤ 15 EU/mL | 137 – 138 | 172 – 198 |
| Soro antitetânico concentrado a granel ^{*(1)} | < 0,773 | < 0,500 | < 1,75 UE/mL | 97 – 135 | 144 – 162 |

Critério de aceitação: 50 – 200 %

^{*(1)} Analisado pelo método de pirogênio in vivo – Especificação: Nenhum dos 3 coelhos deve apresentar aumento da temperatura ≥ 0,5 °C e em caso de reteste no máximo 3 dos 8 coelhos podem apresentar aumento de temperatura ≥ 0,5 °C, e a soma dos aumentos individuais dos 8 coelhos não pode exceder a 3,3 °C

A multi-channel pipette is shown dispensing liquid into a 96-well plate. The pipette has a white body with black tips and is labeled '300' and 'ndorf'. The plate is clear and contains several wells with liquid. The background is a gradient of green and blue.

Conclusões

Conclusões

- Necessidade de substituição do teste tradicional pelo alternativo, considerando os aspectos éticos, econômicos e regulatórios atuais.
- Testes preliminares com os kits **ENDOZYME® II GO** (*bioMerieux*) e cartucho **Endosafe Trillium** (*Charles River*) se mostraram promissores e passíveis de validação analítica.
- **Próximos passos:** Novos testes serão realizados com as duas plataformas, com diferentes matrizes para avaliação de sua aplicabilidade, para posterior validação dos métodos e transferência destes para o Controle de Qualidade.

Agradecimentos

- **Organização do evento (AFSA, CONCEA e HSI);**
- **Gestão do Desenvolvimento Analítico:** Patrícia Carneiro, Rafael Silvestrin e Juliana Galvão;
- **Time do Desenvolvimento Analítico**

Time de P&D Desenvolvimento Analítico



Adriana Andrade

Analista de DA SR



Debora Ferrarin

Analista de DA SR



Ursula de Oliveira

Analista de DA SR



Ana Maciel

Analista de DA PL



Iris Costa

Analista de DA PL



Aline Lima

Analista de DA PL



Deivid dos Anjos

Analista de DA PL



Flávia Lopes

Analista de DA JR



Fabio Sato

Analista de DA JR



Claudia de Souza

Analista de DA JR



Obrigada!

caroline.perez@fundacaobutantan.org.br