

38
2 Ems

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALIDACION DE LA PRUEBA DE LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS
(L.A.L.) COMO UN METODO ALTERNATIVO NO OFICIAL, PARA DETER-
MINAR ENDOTOXINAS EN DIFERENTES PRODUCTOS FARMACEUTICOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

SERGIO ARTURO FLORES GALVEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	pág.
CAPITULO I. INTRODUCCION.	1
CAPITULO II. GENERALIDADES.....	3
A) PIROGENOS DE ORIGEN BACTERIANO	
- DEFINICIONES	3
- PROPIEDADES	4
- REACCIONES FARMACOLOGICAS.....	5
- MECANISMO DE ACCION.....	8
- METODOS DE DETERMINACION DE PIROGENOS.....	10
B) DETERMINACION DE PIROGENOS EN CONEJO.	
- ORIGEN.....	14
- ESTUDIOS PARA ESTABLECER LA PRUEBA.....	14
- COMPARACION DE DIFERENTES TECNICAS FARMACOLOGICAS.....	24
- ESTUDIOS PUBLICADOS DE LA RESPUESTA FEBRIL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ENDOTOXINA.....	26
- SENSIBILIDAD DE CONEJOS A ENDOTOXINA.....	31
- VENTAJAS, DESVENTAJAS Y LIMITACIONES.....	36
C) DETERMINACION DE ENDOTOXINAS POR EL METODO DE LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS. (LAL).	
- ORIGEN.....	44
- PREPARACION DEL LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS.....	45
- MECANISMO DE REACCION.....	45
- PROTOCOLO DE PRUEBA.....	49
- SENSIBILIDAD DEL METODO.....	59
- VENTAJAS, DESVENTAJAS Y LIMITACIONES.....	61

- FALLAS TECNICAS MAS FRECUENTES Y SU SOLUCION.....	68
- COMPARACION DE DIFERENTES LISADOS COMERCIALES.....	72
D) ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LAS PRUEBAS DE LAL Y RESPUESTA FEBRIL EN CONEJO PARA DETERMINACION DE ENDOTOXINAS.	76
E) VALIDACION.....	87
CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL	88
- ASPECTOS RELEVANTES DE LOS MEDICAMENTOS A EVALUAR. ...	88
- IMPLEMENTACION DE LAS PRUEBAS.....	92
- DISEÑO DE LAS PRUEBAS NECESARIAS PARA REALIZAR LA VALIDACION.....	98
- RESULTADOS.	114
CAPITULO IV. DISCUSION.....	121
CAPITULO V. CONCLUSIONES	129
CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	131

I N T R O D U C C I O N

Como ya es conocido, la vía parenteral es el medio más eficaz para la administración de agentes terapéuticos y para la reposición de fluidos orgánicos, electrolitos y nutrientes, ya que su entrada es directa a la sangre lo que implica una alta pureza en su preparación. El gran uso de estos productos en medicina se realiza con seguridad gracias al alto nivel tecnológico y ético alcanzado por la industria farmacéutica.

Pero esto no fue siempre así. Hasta hace algunos años la terapia parenteral iba seguida a menudo de fiebre alta y otros efectos laterales peligrosos. El desarrollo de productos parenterales seguros tuvo lugar hace unos sesenta años cuando **Seibert** y col(15) descubrieron la causa del incremento de la temperatura posterior a la inyección, y la denominaron respuesta pirógena y pirógeno al agente causante de la misma, así también desarrollaron un sistema para la detección de pirógenos, la prueba de respuesta febril del conejo, que fué la base para el desarrollo de la prueba de pirógenos de la farmacopea U.S.P.

La prueba de pirógenos en conejo ha sido utilizada con buenos resultados por 40 años, pero muestra una serie de limitantes y desventajas que hacen que su aplicación no sea del todo conveniente dentro de las pruebas de control de calidad a realizar a los medicamentos parenterales.

Se han estudiado otras pruebas alternativas que superen de algun modo las actuales del conejo, no se ha tenido éxito en estas pruebas por sus limitantes y poca competitibilidad, sin embargo, ha tenido bastante aceptación una prueba relativamente nueva, que utiliza un lisado de células del

Limulus polyphemus, de la cual se menciona ser más sensible, simple, específica y económica, pero a su vez se habla de que no detecta todas las posibles causas de pirogenicidad.

El objetivo del presente trabajo es estudiar y comparar las dos pruebas en productos farmacéuticos, validando la aplicación del lisado de eritrocitos del Limulus (L.A.L.) como un sustituto de la prueba en conejo, aplicado esto a diferentes productos farmacéuticos.

CAPITULO II GENERALIDADES.

A) Pirógenos de Origen Bacteriano.

Los pirógenos se definen como sustancias productoras de fiebre; piretógenas. Son sustancias proteínicas que se encuentran con frecuencia en el agua esterilizada producidas por ciertas bacterias que mueren durante la esterilización, dejando sus cuernos y productos en el agua y que serían la causa de las reacciones febriles consecutivas a las inyecciones intravenosas. (1)

Pirógeno.- Dicese de toda sustancia que eleva la temperatura. Alude el término especialmente a ciertas sustancias filtrables, probablemente proteínicas, aisladas en soluciones destinadas a administrarse por vía endovenosa. (2)

Los pirógenos bacterianos son toxinas elaboradas por bacterias patógenas (4); no son los únicos agentes pirogenéticos producidos por microorganismos ya que gérmenes grampositivos, hongos y virus (3) también producen agentes pirogenéticos. (4)

Las toxinas bacterianas se pueden clasificar en dos categorías: Exotoxinas y Endotoxinas. (4)

Las exotoxinas son proteínas producidas por el metabolismo de las bacterias en desarrollo, son hidrosolubles y se encuentran en solución en el medio en que se desarrollan los microorganismos, pasan a través de filtros bacteriológicos. (4), (5), (6).

La exotoxina elaborada por cualquier tipo de organismo es específica y difiere de la toxina de otras especies. Sin embargo, todas las exotoxi

...s tienen determinadas propiedades fundamentales en común, (lo cual las distingue de las endotoxinas y de las sustancias químicas tóxicas ordinarias), tienen como propiedades ser relativamente inestables, solubles, filtrables, pierden su actividad al estar en reposo o por exposición a temperaturas alrededor de 60°C. (4)

Si esta exotoxina se introduce en el cuerpo de un individuo o animal que sea susceptible a la misma, reproducirá la mayoría de los síntomas y lesiones que caracterizan a la infección natural que produce el organismo el cual dió origen a la toxina. Esta exotoxina no manifestará sus efectos, sino después de un tiempo de incubación a partir de su introducción; además las exotoxinas tienen la propiedad de estimular la formación de anticuerpos específicos neutralizantes, denominados antitoxinas. Las exotoxinas se convierten a toxoides (no venenosos) por almacenamiento o por tratamiento con formalina.

Las endotoxinas. Algunos organismos, particularmente las bacterias gramnegativas no elaboran una toxina soluble al estar vivas, pero las células intactas pueden producir una endotoxina que es liberada cuando las células son desintegradas. (6)

Las endotoxinas bacterianas se distinguen de las exotoxinas por las siguientes propiedades: (5)

- a) Son producidas primariamente, si no únicamente por bacterias gramnegativas.
- b) Son macromoléculas. conteniendo lipopolisacáridos.
- c) Componen una parte integral de la pared celular bacteriana.

riana y se libera únicamente si la integridad de la pared celular es perturbada.

d) Son relativamente estables a el calor.

e) Son menos potentes, y específicas que la mayor parte de las exotoxinas en sus acciones citotóxicas.

f) Su toxicidad parece residir en la fracción lipídica, puesto que sus determinantes antiqénicos específicos se encuentran ubicados en la porción del polisacárido.

g) No forman toxoides.

h) La dosis letal es muy grande (6) comparativamente con la pequeña cantidad de exotoxina requerida para producir el mismo efecto.

Los pirógenos de los gérmenes gramnegativos parecen ser los más activos, produciendo entre otras alteraciones trastornos en la regulación térmica, los cuales se pueden manifestar por una hipotermia en ratas, cobayos y ratones, o bien por hipertermia en el hombre así como en el conejo. (3)

El hombre, conejo, caballo y gato presentan el mismo umbral de respuesta aproximadamente; a grandes dosis de endotoxina de Serratia marcescens, puede ser más fuerte la respuesta pirogénica y tóxica para el hombre que para el conejo. (7)

- Acciones Farmacológicas.

Los pirógenos tienen varias acciones farmacológicas, entre las cuales destacan una modificación en la cuenta de los glóbulos blancos, ini

iendo con una leucopenia pasajera (1)(3)(5), seguida por una leucocitosis, (5)(1)(2) colapso vasomotor (8), hiperglucemia, necrosis hemorrágica de tumores, alteran la resistencia a infecciones bacterianas (5), inhibición del jadeo térmico en los perros, acción inhibitoria de la úlcera (3), efecto sobre la circulación periférica, reducción de la secreción gástrica, fenómeno de Shwartzman (reacciones tisulares a la inyección de los mismos) (5)(3), cambios morfológicos en corteza suprarrenal, modificación en la carga superficial de los eritrocitos, hipotensión (3); cuando son inyectados en cantidades suficientes, causan dentro de unas pocas horas un shock irreversible (5), acompañado habitualmente por una diarrea severa, pueden producir la muerte (3)(5). Es frecuente en la autopsia la pequeña hemorragia en la pared del tracto gastrointestinal, así como las lesiones en vísceras y piel (5)(3); también producen una gran variedad de alteraciones circulatorias (5), alteraciones en la coagulación e hipoferrremia en ratón (3).

El término pirógeno fué utilizado para describir a estos contaminantes porque el efecto de inducción febril de las endotoxinas fue la primera actividad biológica reconocida. (9)

Según indican diversos investigadores, el efecto pirogénico, también se va a producir cuando la inyección se aplica por vía intramuscular intratecal. (10)

Se ha demostrado en conejos y perros que la aplicación de endotoxina en los espacios intratecales fue al menos mil veces más potente en la producción de respuesta febril con respecto a la ruta intravenosa, siendo

información la primera evidencia clínica del incremento de potencia
administración intratecal de endotoxinas bacterianas. (10)

Por otra parte se realizó un estudio comparativo del efecto de
aplicación de un preparado pirogénico de *Pseudomona aeruginosa* por vía
venosa e intramuscular.

Se observó dentro de determinados límites una relación lineal
el aumento de temperatura vs el logaritmo de la dosis. (11)

Inicialmente existe un paralelismo entre las curvas, posteriormen
curva de inyección intramuscular va a llegar más rápido a una meseta;
vándose por lo tanto que en la inyección intravenosa se va a obtener
por incremento en temperatura. (11) (Fig. No. 1)

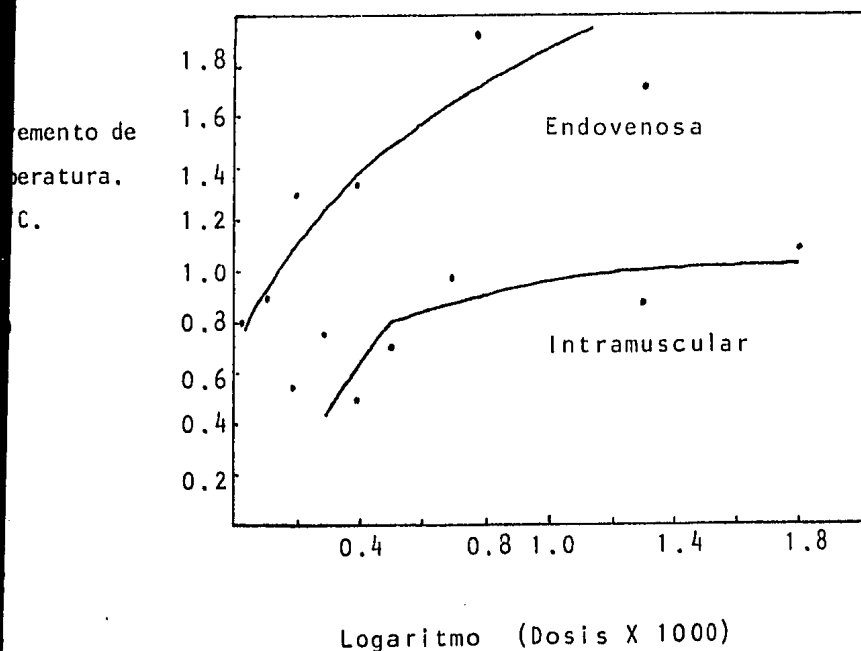


Fig. No. 1

Mediante la aplicación intravenosa la fiebre va a comenzar entre las 30 y 45 min. después de la administración del material pirogénico, alcanzando su máximo efecto en el intervalo entre la segunda y terceras horas, desapareciendo prácticamente entre la cuarta y sexta horas, sin que posteriormente se observen efectos secundarios; en el caso que el material sea altamente pirogénico se podría producir una segunda respuesta.

La aplicación intramuscular pirogénica va a producir el máximo efecto en el intervalo de las 5 ó 6 horas posteriores a la administración; esto es más notorio en los medicamentos aceitosos, los cuales no se puedan aplicar por vía endovenosa, para los cuales puede ser válido su uso por vía intramuscular, siempre y cuando las tomas de temperatura se prolonguen lo suficiente para observar la respuesta febril.

Mecanismo de Acción:

Es relativamente fácil obtener agentes pirogénicos, a partir de los leucocitos.

La acción pirogénica de las endotoxinas se va a ver aumentada si se mezclan con suero normal humano o de conejo a baja temperatura por algunas horas, sin embargo se van a inactivar si son incubadas a 37°C por algunas horas, en combinación con suero o plasma.

Las endotoxinas van a interactuar con lipoproteínas séricas y α globulina al grado de ser inactivadas. (3)

La respuesta al pirogeno bacteriano, posterior a una administración intravenosa, va a dar su máximo valor entre 30 y 50 min, ahora bien, si la misma dosis del pirogeno se coloca en 200 ml de sangre e incuba por

oras, y se inyecta, el período de tiempo en el cual aparece la respuesta menor; lo cual dió a pensar en la posibilidad de que una subs-
 ta de origen endógeno, producida por los glóbulos blancos lesionados por
 pirógeno bacteriano, fuese la que actuase a nivel de los centros termo-
 reguladores en el hipotálamo, produciendo con su interacción la reacción
 febril, para esto se administró el pirógeno de los leucocitos (pirógeno
 endógeno) directamente en la zona preóptica del hipotálamo anterior, con lo
 que se produjo el incremento de la temperatura en pocos minutos. Con obje-
 to de hacer comparación se inyectó en otro lugar; pero para obtener una res-
 ta similar se necesitaron mayores dosis, así como un período de laten-
 cia más largo, debido a que se diluye en el recorrido de la corriente
 sanguínea. En contraste los pirógenos bacterianos, los cuales al inyectarse
 en cualquier lugar deben promover la producción del pirógeno endógeno pro-
 duciendo el aumento de la temperatura. Por lo tanto, aunque el tiempo de la-
 tencia es mayor, su efectividad siempre va a ser la misma. (3)

Los pirógenos bacterianos se diferencian de los endógenos
 en que los segundos son destruidos por el calor a 90°C en 30 minu-
 tos. Actúan directa y rápidamente sobre los centros termorregula-
 dores del cerebro y no crean tolerancia, además no son dializables
 y resisten la acción de la tripsina, quimotripsina, ribonucleasa y
 además no se afecta por cambios de pH desde 2 a 10.5, (las endo-
 toxinas administradas a un mismo receptor, de una manera repeti-
 da provocan que éste se vuelva tolerante, por lo tanto sus res-
 puestas a las endotoxinas provenientes de cualquier microorganismos
 van a ver disminuidas; este estado es reversible después de
 un tiempo de recuperación).

Actividad Pirogénica.

Se admite la naturaleza lipopolisacárida de los pirógenos, algunos autores mencionan polisacáridos y polipéptidos, pero es muy notable la diferencia en la respuesta febril a los pirógenos de los diferentes microorganismos.

Se determinó que la respuesta febril es más fuerte cuando es producida por microorganismos gramnegativos primordialmente bacterias coli, Shigella y Salmonelas. Producen pirógenos con fuerte actividad los microorganismos del grupo de los aerobios esporulados como bacterias pseudoanthracis, mesentericus, subtilis, y esfericus. Estos microorganismos esporulados abundan en el medio ambiente, inclusive en el de los laboratorios, pudiendo contaminar a las soluciones, aparatos, equipo, etc. (3)

En la sección de determinación de pirógenos por conejos se observará mejor lo mencionado en los últimos párrafos.

Es importante tener conocimiento de la naturaleza ubicua de las endotoxinas. Si no se tiene un extremo cuidado para eliminar cantidades tan pequeñas, del orden de pg/ml de endotoxina en preparaciones de sustancias o materiales a ser probados, se pueden obtener respuestas positivas a pirógenos en las pruebas correspondientes. (11)

Determinación de Pirógenos

La determinación de la presencia de pirógenos en las formas farmacéuticas parenterales, ha sido una necesidad de la industria farmacéutica, indispensable para asegurar la calidad del producto y corroborar que se

hicaron buenas prácticas en su manufactura.

Con la finalidad de determinar los pirógenos en dichas formas, han realizado investigaciones de distintas técnicas para su detección, entre las cuales destacan las siguientes:

a) Basado en la leucopenia que produce la administración de pirógenos en los conejos, se realizó un intento para demostrar que un recuento de leucocitos en conejo, podía ser un método más rápido y sensible que el que aconsejaron las farmacopeas (reacción febril en conejo).

En esta investigación se trabajó con *Pseudomona aeruginosa*, preparando una solución pirogénica, e inyectando 10 ml por Kg de peso. Se observo en todas las pruebas leucopenia alrededor de los 30 minutos después de aplicada la inyección, con un aumento simultáneo en la temperatura; posteriormente existía un incremento en la cantidad de leucocitos la cual subía a niveles más altos, de los normales, alcanzando su máximo alrededor de las 12 horas posteriores de la aplicación, finalmente regresaba a los niveles normales en un lapso de 20 a 22 horas después de la aplicación. (3)

b) Un método de pruebas bacteriológicas aplicable a los medicamentos en frasco vial ó ampollita y antes de someterlos a esterilización se basa en la observación del número de microorganismos por ml presentes en productos terminados; tomando en cuenta el número de microorganismos productores de pirógenos de fuerte actividad (1000 unidades), presentes en un ml de solución, que producen un incremento de temperatura de 0.6°C y colocando un límite de contaminación 100 veces menor al antes señalado, se observo así un número máximo de microorganismos contaminantes por ml. En esta investigación se observó que los microorganismos habituales, produ

cen pirógenos de poca actividad, así como contaminantes que no producen pirógenos, lo cual incrementa más aún el margen de seguridad; (13); algunos otros investigadores son partidarios de dicho método, el cual señalan que es fácil de realizar y podría reemplazarse sin inconvenientes a la prueba con conejos.

c) También fué realizada una prueba en perros, se cita que los perros tienen un sistema termorregulador el cual es mucho más estable que el del conejo, y además es menos sensible a los pirógenos, (3), pero ofrece otro cuadro de respuestas adicional como es diarrea y vómitos, además de la leucopenia que al igual que los conejos presentan.

Las características de los animales de prueba son: Un peso aproximado de 15 Kq., temperatura no mayor de 39°C y el número de leucocitos no mayor de 20 000 por mm³. Una vez que se aplica el medicamento se determina la temperatura cada 30 minutos por un lapso de 3 horas; determinándose además a los 45 minutos el número de leucocitos; la interpretación de los resultados fue de la siguiente manera: Una disminución en el conteo de leucocitos de 5 000 o más y un aumento en la temperatura arriba de 5°C son los signos positivos de la presencia de pirógenos. (3)

d) Existe un bioensayo con medición de la respuesta hipoférrica en ratón a las 12 horas después de la inyección de endotoxina. (8)

e) Otro estudio compara bioensayos de endotoxina por letalidad de embriones de pollo (LD₅₀ a 24 horas) y pirogenicidad para conejos y en éste se encontró una gran correlación entre los dos métodos de prueba (8).

f) Se han descrito otros sistemas de prueba usando agentes tóxicos para aumentar la susceptibilidad de los animales de experimentación a las endotoxinas. (8)

g) Un número de pruebas invitro han sido propuestas para la detección de contaminación pirogénica. Se han sugerido algunas pruebas químicas y colorimétricas, pero estas pruebas no son específicas para endotoxinas bacterianas, y sus sensibilidades no han sido establecidas. (9).

h) Las farmacopeas indican determinar la presencia de pirógenos en las soluciones por la respuesta febril que van a producir a los conejos, después de su administración.

i) Un método in vitro relativamente nuevo, realizado con un lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL), está fundado en los trabajos de Levin y colaboradores. (8)

En las siguientes páginas se hablará más a fondo sobre estos dos nuevos métodos, ya que el presente trabajo consiste en evaluar si el método de LAL puede utilizarse como sustituto del método de respuesta febril en el conejo para los productos a validar.

Determinación de Pirógenos en Conejo.

Origen:

La inducción de fiebre por administración intravenosa y su relación con microorganismos se comenzó a esclarecer en 1912, cuando los investigadores ingleses Hort, E.C. y Penfold, W. J. (14) estudiaron el origen y la naturaleza de dicha respuesta. Más tarde Florence Seibert (14) demostró el origen microbiológico de los pirógenos y la característica de ser filtrables, así como la necesidad de agua de alta calidad (para la fabricación de inyectables); éstos trabajos junto con otros, impulsaron el uso de la respuesta febril en conejos como una prueba útil para la detección de pirogénos en parenterales.

Aunque el conocimiento de los pirógenos aún era incompleto, la industria de los parenterales prosperó disminuyendo la incidencia de reacciones pirogénicas por medio de un excesivo y estricto seguimiento a medidas profilácticas y por aplicación efectiva de la prueba de pirógenos en conejo.

Estudios para establecer la prueba:

El criterio de la prueba de pirógenos U.S.P., que fué adoptado en 1942, estuvo basado en los resultados de un estudio colaborativo entre industrias y gobierno (14), (el cual fue inaugurado por el Subcomité No. 3 de Ensayos Biológicos) del Comité de Revisión de la U.S.P. en Junio de 1941). En este estudio la respuesta fué determinada midiendo la temperatura rectal, ésta fué medida posteriormente a la administración intravenosa de una solución de endotoxina preparada a partir de un cultivo de

Pseudomonas aeruginosa, removiéndolo de la superficie del agar, filtrándolo para eliminar el agar y posteriormente lisando la suspensión del microorganismo por acción mecánica en un agitador con cuentas de vidrio por un lapso de 5 horas, incubando después a 37°C por 6 días y centrifugando de 30 a 50 minutos a 4 000 r.p.m., haciendo isotónica la solución con cloruro de sodio, este filtrado constituye la solución pirogénica "stock" para trabajar con ella (15).

Mediante el método anterior se obtiene una solución de una concentración no estandarizada de la substancia pirogénica, por lo cual era deseable determinar algún parametro que se pudiese utilizar como un índice de potencia, para lo cual se escogió el contenido total de nitrógeno como indicador. Se realizaron pruebas a 9 grupos de soluciones obtenidas por el mismo método observándose valores dentro de un rango de 125 a 145 mg/100ml de nitrógeno total y un promedio de 138 mg /100 ml. Posteriormente se repitió la prueba con 6 grupos más y se obtuvieron resultados similares. Mediante pruebas en animales se concluyó que soluciones pirogénicas de aproximadamente igual potencia podían ser preparadas consistentemente por esta técnica, lo cual no era indicativo de que la potencia de la substancia pirogénica estuviese asociada con el contenido total de nitrógeno; sin embargo se utilizó el método como un indicador del poder de la solución pirogénica. Se realizaron pruebas en series de conejos inyectando diferentes concentraciones del pirogeno basadas en la determinación del nitrógeno total; encontrando que una solución conteniendo 5 mg de nitrógeno por 100 ml, e inyectada a conejos de 1.5 a 3.0 Kg., invariablemente producía una típica respuesta pirogénica.

En un estudio colaborativo (16) la solución pirogénica que se utilizó era la que contenía 5 mg de nitrógeno total por cada 100 c.c. de fluido. Las normas seguidas y lo que del estudio se desprendió se enumera a continuación:

Se utilizaron 10 conejos para trabajar el material pirogénico y 5 con una solución de NaCl isotónica. Las temperaturas de control de los animales se tomaron preferentemente en jueves y viernes de la semana previa a la prueba dicha prueba era realizada en lunes o martes de la siguiente semana. En el día de la prueba se tomaban 2 lecturas; a los 15 minutos de la segunda lectura 10 de los animales eran inyectados con la solución pirogénica y 5 con la solución salina, se seguía el procedimiento establecido para la prueba del cual se hablará más adelante. En jueves o viernes de esa misma semana, el mismo procedimiento era repetido exactamente para volver a someter a prueba el lunes o martes; se realizaron pruebas por 5 semanas consecutivas, utilizando los mismos animales; se permitió después un descanso de 3 semanas y los mismos animales fueron inyectados en la primera parte de la novena semana con las mismas soluciones que habían recibido. En la última parte de la novena semana, la prueba fué invertida y los animales que habían recibido solución salina isotónica recibieron solución pirogénica y viceversa, en todos los casos llevando un registro de las temperaturas en controles.

Los animales de prueba eran conejos sanos de 1.5 a 3.0 Kg., alimentados con una dieta uniforme por lo menos por una semana y sin que hubiesen tenido disminución en su peso.

° * referirse a las tablas 1 y 2.

Antes de utilizarlos en la prueba, se tomaban 4 temperaturas rectales a intervalos de 2 horas en los 2 días previos, con el fin de acostumbrarlos al procedimiento experimental y descartar a aquellos que variarían su temperatura más de 1.2°C . Se insertaba el termómetro más allá del esfínter interno, se mantenía por al menos 2 minutos, leyéndose la temperatura. En el día de la prueba se tomaban dos temperaturas rectales en un período de una hora, y el promedio de ambas se consideró como la temperatura inicial; se retiraba el alimento una hora previa a la prueba y durante todo el tiempo que duraba la prueba, se permitía libre acceso a el agua y se controlaba la temperatura y humedad del medio ($\pm 5^{\circ}\text{C}$).

La dosis de la solución pirogénica fué de 3 ml por Kg. de peso, la cual era aplicada a 37°C e inyectada en la vena marginal de la oreja en un espacio de 15 minutos; se determinaron las temperaturas rectales cada hora durante las siguientes cinco horas.

No menos de 5 conejos podían ser utilizados para cada prueba, tres o más mostraban un incremento individual de 0.8°C o más la prueba se consideraba positiva; si únicamente 1 ó 2 de los 5 animales mostraba una respuesta positiva, la prueba podía repetirse con un segundo grupo de 5 animales, considerandose positivo si 2 animales del segundo grupo de 5 animales mostraba un incremento de temperatura de 0.8°C o mayor.

Siguiendo los lineamientos antes señalados se procedió a el estudio en el cual intervinieron 16 laboratorios, analizando el resultado de ellos se delineó la prueba a seguir con las conclusiones a los resultados obtenidos; los resultados que obtuvieron son los siguientes:

Se realizaron un total de 3300 pruebas en 253 conejos de la siguiente manera: 501 pruebas de control durante las cuales los animales fueron sometidos a el procedimiento, 1782 pruebas con el material pirogénico, y 17 pruebas con solución salina fisiológica no pirogénica.

Las variaciones máximas de temperaturas en los días de control fueron mayores a 0.8°C en el 97% de 253 observaciones y no mayor que 0.8°C en 87% de las observaciones.

En el intervalo de 38.7°C a 39.9°C se encontraban 83% de las lecturas, un 15% de los conejos presentaron en uno o más de los días de control una temperatura superior a 39.8°C .

En la determinación de la temperatura inicial se tomaban 2 lecturas de las 5648 observaciones realizadas, la variación máxima entre esas lecturas en un mismo animal en un 98% de los casos no fué mayor a 0.5°C y mayor a 0.2°C en 85% de las observaciones; de lo anterior observando la variación, se argumentó que con una sola determinación de temperatura, tomada a la inyección, era suficiente para tomarse como referencia. Las temperaturas máximas iniciales en los días de prueba mostraban una distribución que no variaba significativamente de la normal, de 2824 observaciones un 12.96% dieron una lectura de 39.2°C ; 85% de las lecturas estuvieron entre 38.8°C y 39.7°C ; de los 253 conejos, 66 o sea el 26% tuvo una temperatura de control máxima mayor a 39.8°C . En la opinión de algunos de los investigadores se consideró que una temperatura de 39.8°C o mayor podía ser considerada como anormal, apareciendo una restricción en la USP XII por lo cual se podían descartar los animales con una temperatura ya sea mayor o bien mayor a los 39.8 grados centígrados, los animales que pre-

sentaron ésta temperatura de control (39.8°C) y que fueron utilizados en el estudio no mostraron una diferencia significativa respecto a los otros animales en su respuesta a los pirógenos.

El reporte de resultados se observa en las siguientes tablas No. 1 y No. 2.

sentaron ésta temperatura de control (39.8°C) y que fueron utilizados en el estudio no mostraron una diferencia significativa respecto a los otros animales en su respuesta a los pirógenos.

El reporte de resultados se observa en las siguientes tablas No. 1 y No. 2.

Pirogénica.

Laboratorio No.	1a. semana		2a. semana		3a. semana		4a. semana		5a. semana		9a. Sem.	Sol. Salina
	°	*	°	*	°	*	°	*	°	*		
PY-1941-1	1.83	1.58	1.28	1.21	1.27	1.27	1.14	1.01	1.17	1.26	1.73	-0.09
PY-1941-2	2.31	2.08	1.80	1.58	1.54	1.58	1.48	1.37	2.01	1.53	1.95	0.05
PY-1941-3	2.24	2.08	1.72	1.50	1.56	1.51	1.57	1.45	1.58	1.61	1.55	0.29
PY-1941-4	2.62	2.23	2.21	1.94	1.75	1.57	2.11	1.45	1.46	1.12	1.90	0.16
PY-1941-5	2.16	2.15	2.17	1.46	1.65	1.27	1.94	1.57	1.64	1.12	1.72	0.18
PY-1941-7	2.21	1.78	1.85	1.46	1.60	1.21	1.70	1.51	1.76	1.49	1.92	0.08
PY-1941-9	2.10	1.65	1.47	1.26	1.42	1.50	1.63	1.78	1.81	1.88	1.96	-0.18
PY-1941-10	1.87	1.96	1.90	1.68	1.70	1.66	1.54	1.36	1.42	1.45	1.83	0.18
PY-1941-11	2.02	2.36	2.18	1.92	2.04	1.77	1.95	1.67	1.99	1.00	2.08	0.19
PY-1941-12	2.38	2.14	1.47	1.64	1.25	1.52	1.47	1.46	1.50	1.64	1.70	0.37
PY-1941-13	1.56	1.64	1.52	1.49	1.15	1.10	1.08	1.29	1.33	1.50	1.57	-0.11
PY-1941-14	2.00	2.05	2.06	1.90	1.93	1.72	2.01	2.00	2.03	1.94	1.68	0.09
PY-1941-15	1.72	1.74	1.52	1.43	0.89	1.27	1.41	1.33	1.67	1.63	1.71	0.24
PY-1941-16A	2.54	2.02	2.02	1.78	2.05	1.86	2.09	1.89	1.78	2.09	2.39	0.21
PY-1941-16B	2.11	1.93	1.91	1.48	2.04	1.75	1.84	1.94	1.76	1.90	1.88	0.07
PY-1941-17	1.64	2.13	1.54	1.51	1.33	1.50	1.69	1.54	1.88	1.61	1.82	0.03
PROMEDIO	2.08	1.97	1.85	1.57	1.57	1.50	1.66	1.53	1.67	1.54	1.83	0.10

Tabla No. 1

° * referirse a página 16.

Cambio de temperatura máximo promedio posterior a la inyección de Sol, Salina.

Laboratorio No.	1ra. semana		2da. semana		3a. semana		4a. semana		5a. semana		9a. sem.	Sol.
	°	*	°	*	°	*	°	*	°	*		
PY-1941-1	0.08	0.35	0.25	0.18	0.21	0.30	0.02	0.09	0.04	0.13	0.24	1.29
PY-1941-2	0.15	0.24	0.12	-0.06	0.22	0.19	0.05	0.13	0.09	0.17	-0.09	1.99
PY-1941-3	0.63	0.34	0.40	0.11	-0.03	0.09	0.19	-0.10	0.25	-0.27	0.46	1.63
PY-1941-4	0.17	0.18	0.11	0.56	0.38	0.35	0.35	0.14	0.25	0.37	0.06	2.53
PY-1941-5	-0.16	0.16	0.12	0.13	0.26	0.01	0.31	0.08	0.27	-0.08	0.21	1.41
PY-1941-7	-0.39	-0.07	0.02	0.12	-0.25	-0.22	-0.03	-0.33	-0.14	0.34	0.00	1.86
PY-1941-9	0.38	0.40	0.19	-0.05	0.06	0.24	-0.09	-0.19	-0.12	0.09	0.00	2.19
PY-1941-10	0.28	-0.16	0.24	0.14	0.20	0.24	0.36	0.21	-0.01	-0.04	0.13	2.17
PY-1941-11	0.34	0.31	0.01	-0.01	-0.11	0.96	0.35	-0.05	0.73	0.50	0.55	1.91
PY-1941-12	1.01	0.96	0.66	0.53	0.75	0.38	0.62	0.53	0.39	0.47	0.59	1.89
PY-1941-13	0.15	0.03	0.00	-0.02	0.10	0.09	-0.13	-0.30	0.03	-0.06	0.04	1.19
PY-1941-14	0.36	0.40	0.00	0.45	0.64	0.50	0.37	0.16	0.34	0.21	-0.10	2.09
PY-1941-15	0.30	0.23	0.43	0.25	-0.09	0.17	0.13	0.41	0.29	0.32	0.54	2.01
PY-1941-16	0.05	-0.06	0.13	0.05	0.09	0.09	-0.04	-0.14	-0.04	-0.08	-0.05	2.15
PY-1941-17	0.11	0.11	0.12	0.09	0.13	-0.01	0.03	0.09	0.09	-0.05	0.26	2.01
PROMEDIO	0.23	0.22	0.18	0.16	0.17	0.22	0.16	0.05	0.15	0.09	0.15	1.88

Tabla No. 2

° * referirse a página 16.

Los resultados sugirieron que los animales se pueden tornar resistentes o tolerantes a la acción termogénica de los pirogenos en la solución inyectada, esto se observa conforme el experimento progresa. Por otra fuente (13) se había demostrado que la substancia responsable de la acción febril no era antigénica.

De las 1587 observaciones realizadas con la solución pirogénica se encontró que el 86.8 % de los incrementos máximos de temperatura ocurrían en un lapso de 3 horas posteriores a la inyección, por lo cual no se consideraba necesario observar a los animales por un período mayor como el de 5 horas que fué utilizado.

Durante las 3 primeras horas después de la administración de la solución pirogénica el máximo incremento en temperatura en un 70 % de los casos fue entre 1 y 2°C; en 1.7 % de los casos los máximos incrementos fueron de 0.5°C o menos (habiendo observado anteriormente que la variación normal de temperatura de los conejos en un 87 % de los casos es menor a 0.6°C, se consideró a este valor (0.6°) como indicativo de la presencia de pirogenos en una solución después de su inyección).

Para los animales que fueron utilizados en la inyección de solución salina libre de pirogenos se siguió la prueba en forma idéntica. Los resultados que se reportan en la tabla mostraron que la inyección del fluido, por si misma no fué responsable de la reacción febril. Además, en un 92 % de las 1017 observaciones el incremento máximo de temperatura fué menor a 0.6°C lo cual sirvió como soporte al límite arbitrario establecido que diferenciara a una respuesta positiva de una negativa; (en un 78 %

de las observaciones el máximo incremento de temperatura fue menor a 0.4°C) observando con esto que existió aproximadamente un 8 % de probabilidad de obtener falsos positivos, se recomendó el uso de un número suficiente de animales no menor a 5.

De la evaluación de datos obtenidos en los 2 días de control se concluyó que por no existir grandes variaciones que fuesen significativas, con un día de control era suficiente. Del mismo modo la determinación de dos temperaturas para obtener la temperatura inicial no arrojó resultados que justificasen dicha medida, por lo tanto se recomendó el tomar una sola temperatura el día de la prueba y considerarla como basal.

De la información y conclusiones obtenidas del estudio se delineó la prueba oficial de pirógenos que apareció en la U.S.P. XII, pero aún quedaban algunos puntos a estudiar para mejorar la prueba, como eran determinar la menor concentración de pirógenos que podían dar una respuesta positiva, la determinación de la sensibilidad de los animales de prueba comparados con el humano, determinar el período de descanso de los animales entre dos pruebas, etc.

Una vez delineada la prueba no ha sufrido grandes modificaciones a través del tiempo, observando la información del estudio colaborativo y la actual prueba de pirógenos de la U.S.P. XXI se puede percatar que permanece prácticamente invariable; sin embargo las diferentes farmacopeas no tienen establecido un protocolo igual a seguir en su prueba, existiendo diferentes variaciones en su desarrollo, condiciones de trabajo e interpretación de resultados.

Comparación de las diferentes técnicas Farmacopeicas:

Esta comparación se realiza entre la farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos (F.N.E.U.M.) 4a. Ed.; United States Pharmacopoeia (U.S.P) XX Ed.; British Pharmacopoeia (B.P.) 1980; Pharmacopée Française (P.F.) 1975, European Pharmacopoeia (E.P.) 1971 y Pharmacopea Helvética (H.) 1971; las técnicas de la B.P., P.F. y E.P. son practicamente iguales, por lo cual se puede considerar la B.P. como representativa de las 3 farmacopeas.

En la siguiente tabla se muestran las características principales de las técnicas y condiciones señaladas en cada farmacopea, observando así sus principales diferencias y puntos comunes: son los que se muestran en la tabla No. 3.

	I. N. E. U. M. 1974 (39)	U. S. P. XX 1980 (40)	R.P. 80, (41) Pharmacopée Française [47] European Pharmacopoeia [43] 1977	Pharmacopée Helvétique 1971 (44)	Técnica a seguir en De Font.
	Conejos sanos, adultos ≥ 1.5 Kg. Dieta uniforme	Conejos sanos, maduros ----- ----- -----	Conejos sanos, adultos ≥ 1.5kg Cualquier Alimento sin antibiótico	Conejos sanos ≥ 1.5 kg. No albino Dieta completa u unifor- me	Conejos, sanos, adultos ≥ 1.8 Kg. Nachos Dieta uniforme
Temperatura	Temperatura uniforme a 3°C durante prueba u las 4 hrs. previas. Aislados, tranquilos y sin perturbaciones.	Temperatura 20 a 25°C sin diferencia mayor a 3°C durante la prueba. Libres de perturbaciones o sea los excitén.	Variación de Temperatura de + 3°C Inquietas, sin riesgo de perturbaciones que ex- citen.	Temperatura 20°C ± 2°C. Luz controlada u aten- uada.	Temperatura uniforme - a 3°C durante prueba y 4 hrs previas. Aislados, tranquilos, sin perturbaciones.
Examen de hijas	-----	Llevar control periódico de plásmenos de los diuréticos utilizados por la hembra	Llevar material con agua para inyectables	-----	Llevar con extra -- enjuagado con agua -- destilada.
Temperatura de des- canso, u - la opera-	250°C 30 min.	250°C 30 min.	250°C ó 200°C 30 min 1 hora	-----	200°C 2 horas
	Clínico Comprobar exactitud -- Determinar tiempo para obtener la lectura.	Clínico o Electrónico Comprobar exactitud -- ± 0.1°C Obtener la lectura en menos de 5 min. En caso de mantener in- yectados los diuréticos de temperatura durante toda la prueba, reteni- erlos en cepas, en los que se permita asumi- er la posición natural de descanso.	Clínico o Electrónico. Comprobar exactitud ± 0.1°C ----- En caso de utilizar ter- mómetro eléctrico inveni- entarlo 30 min. antes de la inyección u mante- nerlo ahí durante la prueba, colocados los animales en cepas que permitan asumir la posición nor- mal.	Clínico o Electrónico ----- -----	Clínico o Electrónico. Comprobar exactitud -- ± 0.1°C 1 min. suficiente para obtener la lectu- ra, se deja de 1.5 a 2 min. En cualquier de los métodos se colocan en cepas durante toda la prueba y una hora y media previa.
Temperatura de control	De 1 a 3 días antes	-----	30 min. antes de inyec- ción.	7 determinaciones antes de la prueba. Últimi que se realice antes de la inyección.	De 1 a 2 días antes. ----- Promedio de dos lectu- ras tomadas a los 40 y 10 minutos antes de la inyección.
Temperatura de inyec- ción	40 min antes de inyec- ción.	< 30 min. antes de in- yección.	Promedio de las tempera- turas tomadas a los 40 y 10 min. antes de la in- yección.	-----	Promedio de dos lectu- ras tomadas a los 40 y 10 minutos antes de la inyección.
Temperatura de inyec- ción	> 7.5 cm. Temp. > 39.4°C	> 7.5 cm. Temp. > 39.8°C	> 5 cm. 39.8°C Temp. > 38.0°C	5 a 6 cm. 39.8°C, Temp. > 38.5°C	> 4.5 cm. 39.8°C a 38.5°C inclu- sive.
Variación de temperatura	Variación > 1°C entre toma de toma	Variación > 1°C entre toma y toma	Variación > 1°C entre toma y toma	-----	Variación permitida no mayor a 1°C entre toma y toma.
Preparación	-----	Antes de utilizar a un conejo por primera vez no más de 7 días antes de la prueba, hacer un simulacro con todos -- los jascos sin inyec- ción.	Llevar a tres días antes de la prueba aplicar 10- ml/Kg de sol. de NaCl -- isotónica y libre de pi- rrolanos, a conejos que no han sido utilizados -- en las dos semanas pre- vias. Señalar paso a paso la -- prueba y descartar a -- aquellos que varían más de 0.6°C.	-----	Antes de utilizar a un conejo por primera vez, se lleva un programa -- de adaptación, tanto -- a el medio ambiente co- mo a el manejo; poste- riormente se hace un simulacro con todos -- los jascos sin inyec- ción, un segundo simu- lacro se hace inyectan- do 10 ml/Kg de sol. de NaCl isotónica u libre de pirlanos para des- cansar a aquellos que varían más de 0.6°C u posterior la prueba has- ta que la variación de temperatura sea mínima.
Medio	Nada durante la prueba	Nada durante la prueba	Trabaja en un area de- pasada de la habitual. Nada durante la noche y la prueba	-----	Trabaja en un area se- parada de la "gabineta" Nada durante la noche y la prueba.
Alimentación	Libre acceso	Puede ser restringida	Retener durante la Prue- ba	-----	Nada durante la prueba
Medio de inyección	≈ 37°C Intravenosa ≈ 10 ml/Kg ≈ 2 min	37°C ± 2°C Intravenosa ≈ 10 ml/Kg ≈ 10 min	38.5°C Intravenosa Entre 0.5 y 10 ml/Kg 4 min.	20°C 5 ml/Kg 4-6 ml/min.	37 ± 2°C Intravenosa ≈ 10 ml/Kg. ≈ 2 min.
Temperatura de inyección	1, 2 y 3 horas	1, 2 y 3 horas	Mínimo a 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos.	30, 60, 90, 120 y 180 minutos; eventualmen- te a 240 min.	1, 1 y 3 horas
Repeticiones	3	3	3	3	3
Repeticiones en caso de des- canso	5	5	3 y 3 hasta un total de 12	3	5
Resultados	Si ningún conejo incre- menta 0.6°C ó más u la suma total de incremen- tos no supera a 1.4°C.	Si ningún conejo incre- menta 0.6°C ó más u la suma total de incremen- tos no supera a 1.4°C.	Si la suma de incremen- tos no supera a 1.15°C	Si ningún conejo incre- menta 0.6°C ó más y la suma total de incremen- tos no supera a 1.4°C.	Si ningún conejo incre- menta 0.6°C ó más y la suma total de incremen- tos no supera a 1.4°C.
Resultados adicionales	Si uno o más conejos pre- sentan un incremento de 0.6°C ó mayor o si la su- ma total excede de 1.4°C.	Si algún conejo presen- ta un incremento de -- 0.6°C ó mayor o si la suma total excede de -- 1.4°C.	Si la suma de incremen- tos supera a la primera semana pero no a la se- gunda 1.15°C ± 0.25°C [3 conejos] 2.60°C ± 0.35°C [6 "] 4.45°C ± 0.95°C [9 "] 6.60°C ± 0.60°C [12 "]	Si únicamente uno de los conejos presenta un incremento de 0.6°C ó mayor, si la suma to- tal de incrementos -- excede de 1.4°C.	Si uno o dos conejos presentan un incremen- to de 0.6°C ó mayor, o si la suma total excede de 1.4°C.
Resultados adicionales	Si más de 3 conejos mues- tran incremento de 0.6°C ó mayor, o bien, si la suma total de incremen- tos excede a 3.7°C.	Si más de 3 conejos -- muestran incremento de 0.6°C ó mayor, o bien, si la suma total de in- crementos excede a -- 3.7°C.	Si la suma de incremen- tos supera la semana -- Columna del parato an- terior.	Si la media de los in- crementos es igual a -- 0.5°C ó menor.	Si más de 3 conejos -- muestran incremento de 0.6°C ó mayor, o bien, si la suma total de in- crementos excede a -- 3.7°C.

TABLA No. 3.

- Estudios publicados de la respuesta febril a diferentes concentraciones de endotoxinas.

Se han realizado estudios para diseñar una prueba cuantitativa en conejos con la respuesta febril, así como también para determinar la sensibilidad de las colonias de conejos a diferentes endotoxinas, con la finalidad de evaluar la prueba y tener un mayor margen de seguridad en los resultados.

Un estudio realizado en 1948 (17) describe un método cuantitativo para determinación de pirogenos, basado en la relación directa del logaritmo de la dosis pirogénica y el promedio del incremento de temperatura máxima alcanzada después de la inyección en los conejos.

Para los propósitos de la prueba, se establece "una unidad pirogénica, como la pirogenicidad presente en 0.1 mg de un estándar pirogénico seco - este estándar fue preparado a partir de una vacuna de *Pseudomonas* - tal unidad fue escogida así debido a que la inyección intravenosa de dicha cantidad de material por Kg de peso, produce una respuesta promedio en incremento de temperaturas de 1.0°C por conejo; para garantizar esta respuesta se procedió periódicamente a probar la colonia de conejos y aquellos animales que repetidamente manifestaron respuestas menores a 0.6°C y mayores a 1.7°C a una unidad pirogénica fueron retirados de la colonia.

La relación lineal obtenida experimentalmente por la curva dosis-respuesta fue: $y = 1.00 + 0.78 X$; en donde:

y = Máximo incremento promedio en °C.

1.00 = a, máximo incremento promedio en °C.

Para la unidad pirogénica por Kg. (esto es cuando $X = 0$).

0.78 = b, pendiente de la curva (esto es un incremento de 0.78°C en la respuesta por aumento de 10 veces la dosis pirogénica).

X = Log de la dosis por Kg en unidades pirogénicas.

El valor de 0.78 de la pendiente de la recta fué obtenido de 3 de 5 experimentos en los que se comparó animales de diferentes pesos y diferentes sensibilidades, siendo válido para conejos de alrededor de 2 Kg., teniendo temperaturas de control abajo de 39°C y con la sensibilidad de aproximadamente 1°C a una unidad pirogénica.

Entre otras características se observó una relación inversa entre el peso corporal y la temperatura de control. Fig. No. 2.

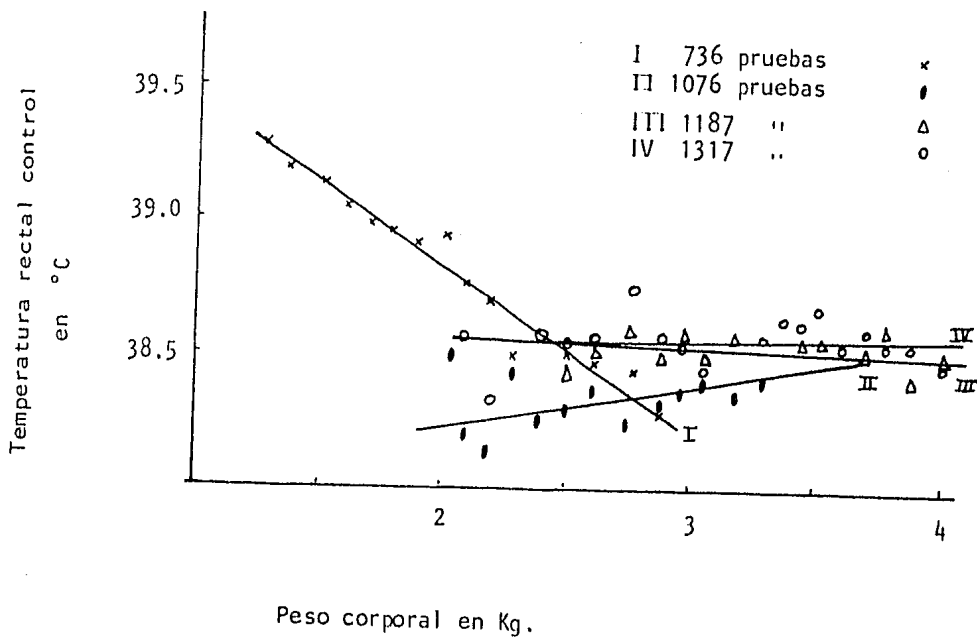


Fig. No. 2

Dicha relación aparentemente termina cuando el peso oscila entre 2 a 4 Kg. Durante los 12 meses en que alrededor del 96% de los animales se mantuvieron en un rango de peso de 2 a 4 Kg. la temperatura promedio de control estuvo uniforme cerca de 38.5°C.

La precisión de este ensayo es relativamente baja comparada a otros ensayos biológicos, sin embargo, una manera directa de incrementar la precisión del ensayo es aumentar el número de animales de prueba; ya que el error estándar de la pirogenicidad es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de el número de animales usado en el ensayo.

$$\% \text{ E.S.} = \frac{s \times 230.3}{b \times \sqrt{N}}$$

Para este ensayo, $s = 0.4^\circ\text{C}$, el error estándar calculado para 4 conejos es aproximadamente de un 60 % y 84.35% para 3 conejos.

En estudios realizados para conocer diferentes sustancias pirogénicas, determinando su potencia y la sensibilidad de los conejos a éstas, se prepararon pruebas con extractos derivados de *Aerobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae* entre otros.

Para *Aerobacter aerogenes* se comprobó una mayor potencia comparado con *Pseudomona aeruginosa*, de alrededor de 20 veces la concentración en mcg/ml para obtener la respuesta pirogénica (0.7°C) y 100 veces mayor estabilidad térmica (en mcg/ml) después de 40 minutos a 120°C , determinada por su respuesta después de ser inyectada a los conejos. (18)

Para *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 12833) se determinó (19) la dosis a la cual produce la respuesta pirogénica (0.6°C según U.S.P.) y la

esto realizado en grupos de ocho conejos y llevado a cabo en 12 laboratorios; la dosis con la cual se produjo la respuesta pirogénica fue de 0.5 mcg/Kg. (obtenido de la curva) Fig. No. 3 que comparado con *Aerobacter* *aerogenes* (≈ 10 mcg/ml. (18) es aún más reactiva que ésta. De la misma manera la DE_{50} fué de 0.5 ng/Kg (obtenido de la curva) Fig. No. 4; reportando un factor de acuerdo a la U.S.P. la DE_{50} de 1.0 ng/Kg.

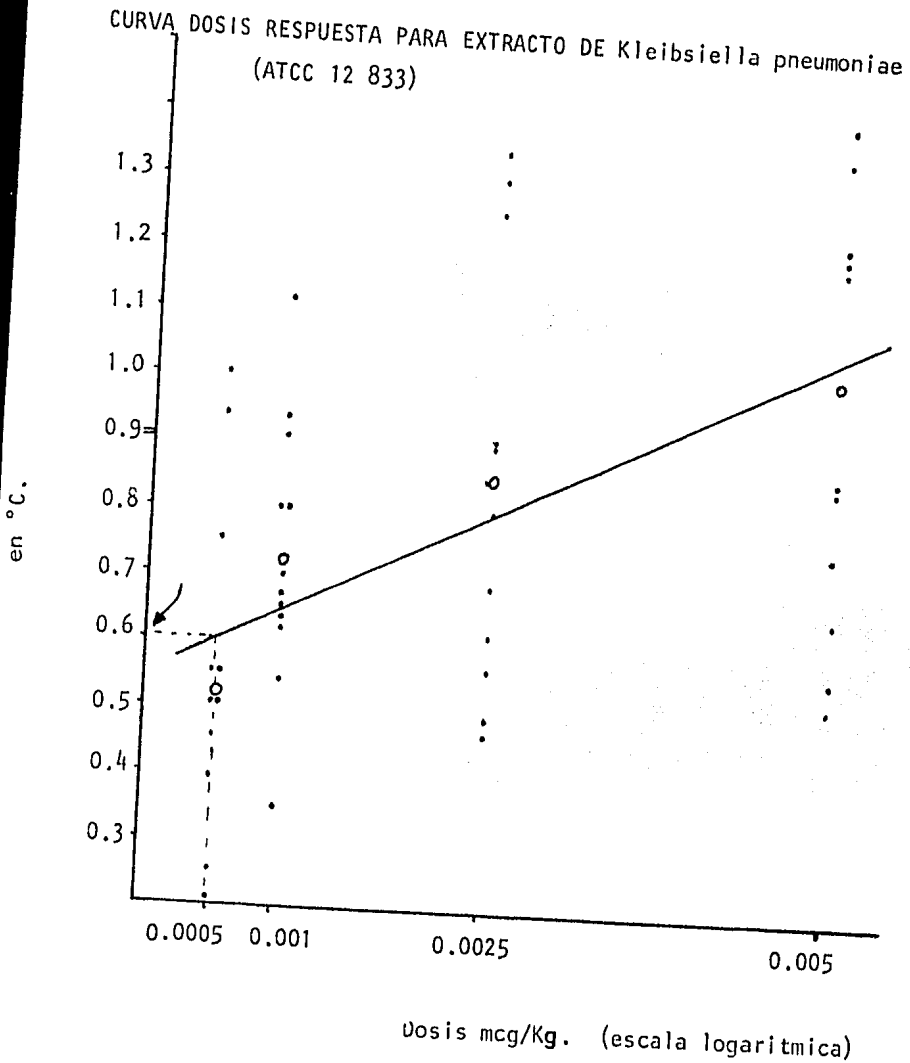


Fig. No. 3

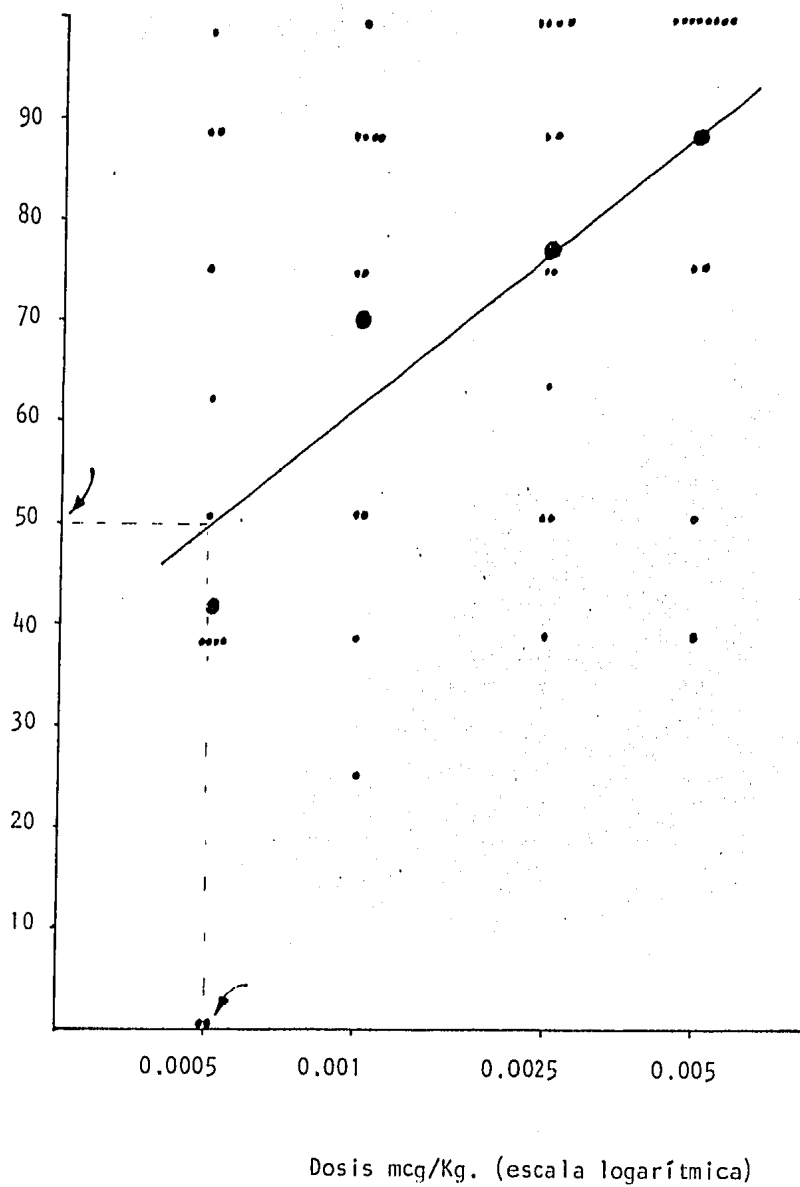
CURVA DOSIS RESPUESTA PARA EXTRACTO DE *Aerobacter aerogenes*

Fig. No. 4

— Sensibilidad:

La prueba de pirógenos en conejo, (actualmente) tiene como una base la presunción de que la dosis umbral de la endotoxina, para provocar una reacción pirogenica es igual en el hombre que en el conejo. No existe evidencia de la capacidad de la prueba con los conejos para establecer niveles umbrales en reacciones pirogenicas debidas a partículas en general o de naturaleza química. (27)

La sensibilidad de los conejos a diferentes endotoxinas purificadas ha sido determinada: la inyección intravenosa de endotoxina de *E. coli* a cuatro diferentes dosis en un rango de 0.005 a 0.04 mcg/kg reportó los sigs. resultados. (8):

Dosis	Respuesta Pirogenica
mcg/Kg	0.5°C o más
0.005	1/5
0.01	2/5
0.02	4/5
0.04	5/5

Tabla No. 4

Se calculó la dosis pirogenica 50 (DP_{50}), la cual fué de 0.011 (0.006 - 0.02) mcg/Kg.

Similarmente se trabajó con *Klebsiella sp* a 4 diferentes dosis, con un rango de 0.6 a 4.8 pg/Kg obteniendo los sigs. resultados. (8).

Dosis $\mu\text{g}/\text{Kg}$.	Respuesta pirogénica 0.5°C o más.
0.5	0/3
1.2	1/3
2.4	1/3
4.8	3/3

Tabla No. 5

La DP_{50} fue de 2.1 (0.7 - 6.6) $\mu\text{g}/\text{Kg}$; de lo cual se observa que la endotoxina de *Klebsiella* es aproximadamente 5 veces más potente que la de *E. coli* en su inducción febril (8)

Otros reportes de diferentes autores muestran los siguientes resultados de DP_{50} en ng/Kg .

Endotoxina	Mills ⁽²⁷⁾	Castor ⁽¹⁹⁾	Rudbach ⁽²⁷⁾	van Noordwijk ⁽²⁰⁾
<i>E. coli</i> .	0.55		0.86	0.5
<i>K. pneumoniae</i>	3.5	1.0		5.0
<i>S. typhimurium</i>	0.74			
<i>S. enteritidis</i>	1.6			
<i>S. abortus equi</i>	1.35			
<i>S. flexneri</i>	0.9			
<i>S. marcescens</i>	1.4			
<i>S. minnesota</i>	1.4			

Tabla No. 6

Tres estudios con endotoxina purificada derivada de *E. coli*, indican que la DP_{50} es aprox. de 1.37 a 2.2 ng/Kg . (Tabla No. 7).

Endotoxina	DP ₅₀ ng/kg.	Intervalo de confianza
055: B5	1.57	0.98 o mayor (21)
127: B8	2.2	1.06 - 2.42 (27)
EC - 2	1.37	1.04 - 1.79 (22)

Tabla No. 7

La endotoxina de *E. coli* EC - 2 es la endotoxina estándar de referencia utilizada para la USP XX, su actividad pirogénica en conejos se observa en la figura No. 5, (22).

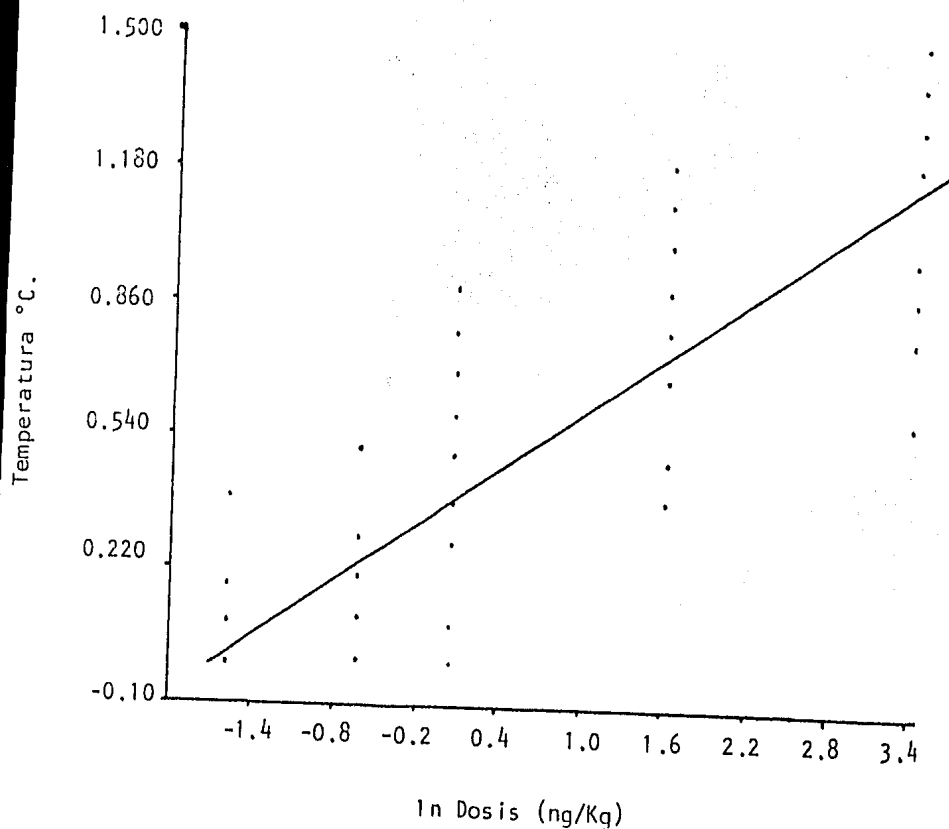


Fig. No. 5

La endotoxina EC₅ es la nueva endotoxina oficial que substituye a EC-2 y es aprox. el doble de potente. (45).

La relacion entre la respuesta febril en conejo comparada con el hombre ha sido estudiada, obteniendo una equivalencia en base a la dosis Kg de peso a niveles de inducción de la respuesta febril, sin embargo, conforme la dosis es incrementada el hombre responde más vigorosamente que conejos (7) (8).

El estudio fue realizado con diferentes endotoxinas, obteniendose información que se muestra en la tabla No. 8.

Endotoxina (en ng/Kg)	Greisman (8)		WOTF (43)	
	Hombre	Conejo	Hombre	Conejo
Pseudomonas sp	50_70	50_70		
E. coli	1.0	1.0		
Sal. typhosa	1-1.4	0.1_1.4	5.0	50.0
Sal. abortus equi			2.0	5.0

Tabla No. 8

REACTIVIDAD A ENDOTOXINAS BACTERIANAS

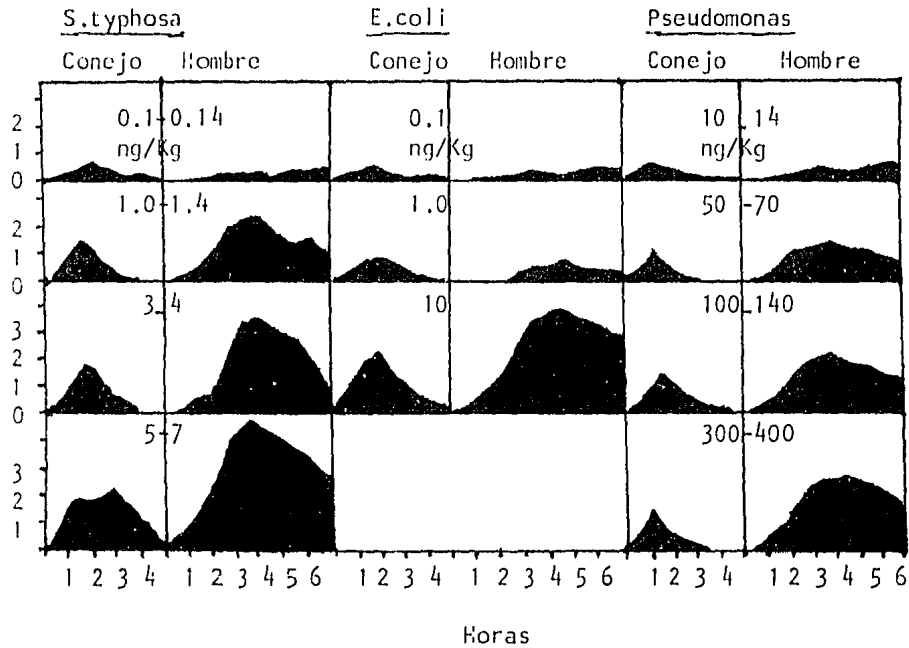


Fig. No. 6

Con la información anterior se puede observar porque todo esfuerzo por hacer la prueba en conejo de manera cuantitativa ha fracasado, para fines prácticos los lipopolisacáridos de los Gram (-) son infinitamente heterogéneos (Si bien un producto puede contener predominantemente un organismo) y el requerimiento primario de un bioensayo comparativo no puede ser llevado a cabo. Además los microorganismos Gram (-) son habitantes normales de los intestinos de los animales, y por toda su vida los conejos están continuamente expuestos a ellos, por ingestión, inhalación y a través de la piel; por lo tanto dependiendo de la exposición previa se puede modificar la respuesta a la endotoxina por estar inmunizado a una variedad indeterminada de bacterias Gram (-) (23).

Finalmente se tenía la idea de que la respuesta febril, era de-

diente de la concentración de pirógeno en la solución por ml. y no de la cantidad total de pirógeno inyectado por Kg. de peso; se demostró lo contrario inyectando 2 ng de endotoxina de E. coli. (Difco, 0127:B8) por Kg de peso en diferentes volúmenes obteniendo la información (22) de la tabla No.

Respuesta de conejos a dosis constante de endotoxina en diferentes volúmenes.

Dosis	Incremento de temperatura (°C)	Promedio (°C)
2 ng de endotoxina por Kg de peso en 1 ml de solución.	0.0-0.7-0.7-0.2-1.0 1.1-0.6-0.3-0.4-1.0	0.60
2 ng de endotoxina por Kg de peso en 5 ml de solución.	1.2-0.7-0.9-0.4-0.9 0.4-0.5-0.4-0.0-0.2	0.56
2 ng de endotoxina por Kg de peso en 10 ml de solución.	0.9-0.1-0.5-0.2-0.6 1.0-0.5-0.6-1.1-0.4	0.59

Tabla No. 9

Ventajas, desventajas y limitaciones.

Por alrededor de 30 años, la prueba para determinación de pirógeno en conejo ha sido el único procedimiento digno de confianza descrito en todos los métodos internacionales. En general ha funcionado bien. Sin embargo en adición a lo elaborado, alto costo y dificultad en ejecución, la prueba en conejos sufre de la variabilidad que es característica en todos los sistemas biológicos. (24)

Todas las pruebas oficiales para pirógenos en conejo utilizan un

nivel seleccionado arbitrariamente de respuesta febril como punto de referencia para aceptar o rechazar el material de prueba. En este punto de referencia, se puede esperar que la mitad de las soluciones marginalmente pirogénicas puedan pasar la prueba. A continuación se muestra la tabla No. 10 con resultados que indican que hay una relación entre dosis y respuesta a endotoxina, sin embargo, la desviación estándar y coeficiente de variación sugieren una variación grande en la respuesta de los conejos relativa al valor medio de dichas respuestas, a la concentración y a las dosis bajo consideración.

Resultados en pruebas con ocho conejos inyectando solución salina con endotoxina E. coli 055:B5

E. coli Concentración de endotoxina (ng/ml)	Volumen inyectado de solución (ml/kg)	USP		Desviación Estandar (°C)	Coeficiente de Variación (%)
		Incremento total de temperatura (°C)	Incremento Temperatura medio (°C)		
3.125	1.0	7.80	0.975	0.246	25.2
1.56	1.0	4.75	0.594	0.218	36.7
1.00	1.0	3.70	0.462	0.158	34.2
0.78	1.0	1.40	0.144	0.208	144.4
0.39	1.0	1.00	0.088	0.187	212.5
0.195	1.0	1.20	0.150	0.065	43.3

Tabla No. 10.

En la tabla No. 11 se muestran los resultados de 7 pruebas con 8 conejos según la U.S.P. que no pasan la prueba siguiendo el criterio de la

los incrementos de temperatura, encontrándose estos resultados en el punto marginal para aceptar o rechazar el material de prueba(24). Se da la diferente respuesta a una misma dosis de endotoxina.

Se realizaron dos de siete pruebas U.S.P. con ocho conejos, las cuales no fueron exitosas siguiendo el criterio de la suma de incrementos individual-

DOSIS	PRUEBA						
	A	B	C	D	E	F	G
	.25	.35	.20	.40	.30	.35	.10
	.35	.35	.20	.40	.30	.40	.35
	.35	.40	.30	.40	.50	.40	.40
	.40	.40	.40	.50	.55	.45	.55
	.45	.45	.60	.50	.60	.50	.60
	.55	.50	.60	.60	.65	.50	.65
	.65	.65	1.10	.65	.70	.55	.85
	.70	.70	1.15	.70	.85	.60	.90
	3.70	3.80	4.55	4.15	4.45	3.75	4.40
	0.46	0.48	0.57	0.52	0.56	0.47	0.55

Tabla No. 11

Con esta información se puede construir la Tabla No. 12 con las diferentes combinaciones de tres conejos, las cuales de haber sido probadas de este modo hubiesen pasado la prueba sin problema alguno; existen 56 combinaciones en los 8 conejos, lo cual sería el 100% de los casos. Se puede decir que cuando más próximo está el valor de la suma de incrementos a 3.8°C es mayor la probabilidad de que pase el producto a probar.

Porcentaje de todas las posibles combinaciones de respuesta de los conejos, que aprobarían la prueba en grupos de 3. (56 posibilidades).

Prueba	Incremento total	Combinaciones de 3 conejos que pasan la prueba	%
A	3.70°C	(1,2,3) (1,2,4) (1,2,5) (1,2,6) (1,3,4) (1,3,5) (1,3,6) (2,3,4) (2,3,5) (2,3,6) (2,4,5) (2,4,6) (3,4,5) (3,4,6) (3,5,6)	26.78
B	3.80°C	(1,2,3) (1,2,4) (1,2,5) (1,2,6) (1,3,4) (1,3,5) (1,3,6) (2,3,4) (2,3,5) (2,3,6) (2,4,5) (2,4,6) (3,4,5) (3,4,6) (3,5,6) (4,5,6)	28.57
C	4.55°C	(1,2,3) (1,2,4) (1,3,4) (2,3,4)	7.14
D	4.15°C	(1,2,3) (1,2,4) (1,2,5) (1,3,4) (1,3,5) (2,3,4) (2,3,5)	12.50
E	4.45°C	(1,2,3) (1,2,4) (1,3,4) (2,3,4)	7.14
F	3.75°C	(1,2,3) (1,2,4) (1,2,5) (1,2,6) (1,2,7) (1,3,4) (1,3,5) (1,3,6) (1,3,7) (2,3,4) (2,3,5) (2,3,6) (2,3,7) (2,4,5) (2,4,6) (3,4,5) (3,4,6)	30.36
G	4.40°C	(1,2,3) (1,2,4) (1,3,4) (2,3,4)	7.14

Tabla No. 12

En estas mismas pruebas una dosis de endotoxina, que inicialmente paso la prueba en ocho conejos, reinyectandola misma dosis en ocho conejos diferentes, pero de la misma colonia, definitivamente pasó la prueba (24). Diferentes referencias confirman que los conejos desarrollan tolerancia a las endotoxinas y que es posible que algunas colonias puedan volverse refractarias después de inyecciones repetidas de dosis menores a las umbrales durante las pruebas rutinarias. (24)

Recientemente se ha demostrado que los radiofarmacos inyectados intratecalmente en el fluido cerebroespinal pueden producir reacciones pirogénicas a dosis mucho más bajas que las detectables por los conejos al ser inyectadas intravenosamente (24); según otros investigadores la endotoxina es al menos 1000 veces más tóxica intratecalmente que intravenosamente. (25)

Otra fuente reporta que una hormona, para el desarrollo humano puede no pasar la prueba a 5 mg/kg de conejo, pero a 0.5 mg/kg pasa sin ningún efecto adverso observado en niños, ¿Cuál es la base o criterio para seleccionar la dosis adecuada?. (23)

El protocolo oficial de prueba de pirógenos es inaplicable para examinar algunos farmacos, debido al efecto farmacológico que éstos producen en los conejos. Por ejemplo: epinefrina, azul de metileno, antitericina B son inherentemente pirogénicos. El ión fosfato, libre de pirógenos, puede inducir una respuesta febril cuando es inyectado en cantidades suficientes. Inversamente, gluconado de calcio, algunos sedativos, anestésicos, corticosteroides, derivados de fenotiazinas y farmacos anti

Estos pueden bajar la temperatura y enmascarar el potencial pirogénico de la solución a probar (8), estos son solo algunos ejemplos de fármacos con tales características.

La respuesta obtenida en una prueba depende de la hora a que los conejos son inyectados; por ejemplo: si se inyecta a los conejos a las 10 hrs se puede obtener una respuesta inferior que si el material es inyectado a las 14:00 hs. Pudiendo existir grandes diferencias como una respuesta satisfactoria o un resultado muy próximo al punto de rechazo; por lo cual se recomienda que la hora de inyección es un factor que se debe tener en cuenta. (23)

Se ha demostrado que la respuesta febril no es la misma en las diferentes estaciones del año, una dosis de 3.5 ng/kg. dada en verano, produce un aumento muy pequeño en la respuesta térmica el cual no rechaza a un producto. En cambio, la misma cantidad dada en invierno, produce un aumento tan significativo que conduciría al rechazo del producto. (3)

Otro estudio confirmó que los materiales a probar que no ocasionan la respuesta febril en conejo, es extremadamente improbable que causen la reacción en el hombre. En todos los casos donde el paciente tuvo una reacción severa, se obtuvo también una reacción muy severa en conejos. (23)

Se tiene noticia que por bloqueo del sistema Retículo Endote —
l se puede incrementar la sensibilidad a los pirógenos, pero esto due
acarrear una serie de problemas con los animales si es utilizado de
manera rutinaria, esto se ha aplicado en los casos de existir tole-
ncia a los pirógenos . (23)

La prueba para pirógenos descrita en la F.N.E.U.M. y USP XX tiene
desventaja de que al obtener una respuesta positiva se impide el uso
los mismos conejos por 2 semanas (según la B.P. 80 esto debe ser por
semanas), pudiendo utilizar hasta 8 conejos (12 según B.P. 80).

Diferentes investigadores hacen varias recomendaciones para obte-
r mejores resultados, entre las cuales destacan:

Los conejos no deben colocarse en aparatos de contención durante las
condiciones de temperatura, para evitarles el enfriamiento debido a la
movilidad. (3)

La inserción del termómetro más allá del esfínter interno no es preci-
, debiendo ser al menos de 5.5 cm. ya que cuanto más profunda es mayor
temperatura. (3)

Tratándose de solución de cloruro de sodio, glucosa, etc., no es indis-
nsable calentarlas a 37°C, basta que tengan la temperatura del medio am-
ente. (3) ($\approx 20^{\circ}\text{C}$)

Es conveniente que se determine la sensibilidad a pirógenos de los co-
jos nuevos antes de ser utilizados por primera vez (3); se admite que
una colonia de relativa importancia es normal que haya un 2% de cone-
s hipersensibles, 27% de hiposensibles y 71% normales. (3)

El envejecimiento de los conejos puede ser causa de error , dando los más viejos en la colonia, valores más bajos que los nuevos. (3)

Es difícil establecer que relación hay entre dosis y tolerancia. Tanto dosis grandes como pequeñas provocan tolerancia; la frecuencia de la dosis tiene poca incidencia sobre el desarrollo de la tolerancia, esta es provocada por una sola dosis y esta es progresiva durante los 7 siguientes días; si se aplican más dosis, muchas veces se demora la recuperación.

El restablecimiento comienza al noveno día de la última inyección de pirógeno.

Se afirma que el tiempo promedio de recuperación es de 21 días en los casos en que la variación fue grande, hubo casos en los cuales se recuperaron a los 14 días, y otro que a los 21 días estaban lejos de recuperarse. (3)

Ninguno de los métodos en vivo u otros bioensayos son más sensitivos y/o más rápidos que el ensayo en conejos. (8)

C) Determinación de endotoxinas por el método de Lisado de Amebocitos de Limulus (L.A.L.)

— Origen: En 1902 Loeb fué quien dió a conocer por primera vez la coagulación intravenosa en el *Limulus polyphemus*. En 1956 Bang llevó a cabo un estudio profundo sobre una enfermedad del *Limulus* la cual finalizaba con la coagulación intravascular y la muerte de el animal. En 1964 Levin y Bang demostraron que la etiología de esta enfermedad era debida a una endotoxina. En 1968 Levin y Bang observaron que el lisado de células preparado a partir de los amebocitos de *Limulus polyphemus* provenientes de la sangre circulante podía formar un gel en presencia de nequeñas cantidades de endotoxina (pirógeno); ellos utilizaron la prueba para detectar endotoxemia clínica. En busca de una prueba rápida para pirógenos en medicamentos radioactivos, se comenzó en 1969 a estudiar las aplicaciones de esta prueba para parenterales, demostrando que la prueba de *Limulus* es más sensible que la del conejo y podía ser aplicada a probar medicamentos, si se cumplian determinadas condiciones.(25)

Limulus polyphemus (el cangrejo herradura) se localiza en lugares específicos a lo largo de la costa este de norte América hasta Yucatán; en adición dos pequeñas especies de *Limulus* estan establecidas en las aguas superficiales de Asia, desde Japón a la India, incluyendo Filipinas y Borneo (10)(3). Estos fósiles vivientes de 300 millones de años, no son cangrejos, tienen relación con la familia de arácnidos de altamar. Los especímenes de mayor tamaño se observan en las aguas costeras de los estados del Atlántico medio en los Estados Unidos de Norteamérica; las hembras son de mayor tamaño que los machos. (8)

preparación del L.A.L.

Los animales con los cuales se va a trabajar son colocados en agua a temperatura ambiente; posteriormente son estimulados de manera que expongan una membrana localizada entre los segmentos torácico y abdominal, para poder efectuar una punción cardiaca se limpia el área de inserción de la aguja con alcohol al 70% la sangre de color azul se recibe en recipientes libres de endotoxinas las cuales contienen solución isotónica de N-etilmaleimida que actúa como un anticoagulante, y solución amortiguadora de tris. (26)

En Limulus de 30 a 35 cm, da alrededor de 150 ml de sangre (3) se aíslan los amebocitos que son las únicas células sanguíneas circulantes y se lavan 3 veces con la solución isotónica de N-etilmaleimida (26), una vez realizada esta última operación se procede a lisis de las células, lo cual se puede llevar a cabo por 3 métodos: ultrasonido, choque mecánico (por ejemplo, en un vortex) o lisis osmótica; posteriormente, se liberan los restos celulares por centrifugación removiendo el sobrenadante, el cual va a ser depositado en frascos viales para ser liofilizados y cerrados al vacío. El liofilizado es sensible al calor por lo cual se requiere de refrigerar de 4°C o bien si está reconstituido a -10°C por un mes como máximo. (10)

Mecanismo de Reacción:

Levin y Bang fueron los primeros en sugerir que la reacción de liofilización del L.A.L. se iniciaba por un mecanismo enzimático, el cual es mediado por la endotoxina. (27)

En exámenes del gel formado por la reacción se descubrió una ma

triz de fibras muy finas de 50 a 100 nm de diámetro. Yin y otros investigadores demostraron la especificidad de la endotoxina como activador de la enzima procoagulante. Los principales aspectos del mecanismo de gelificación del L.A.L. han sido bien establecidos. (27)

Se precisa de la presencia de 4 sustancias para que se lleve a cabo la reacción de coagulación, éstas son: la enzima procoagulante, las proteínas coagulables, los cationes divalentes Ca^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} y la endotoxina de bacterias Gramnegativas. La temperatura óptima y los rangos de pH para la reacción in vitro son respectivamente 36 a 38°C y 6 a 7.5. (27)

El mecanismo de la reacción implica la activación de la enzima procoagulante por Ca^{++} y la endotoxina, tal como se muestra a continuación en la figura 7.

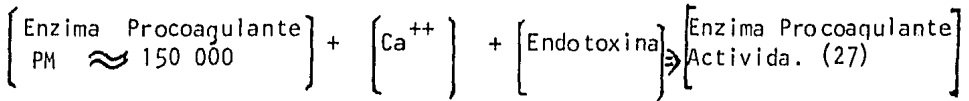
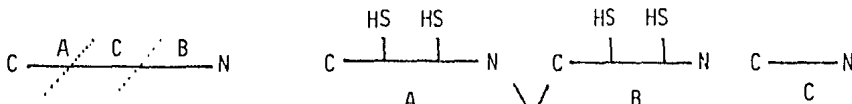
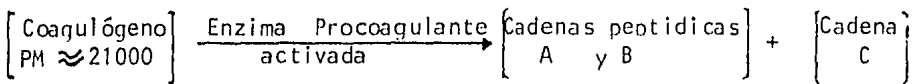
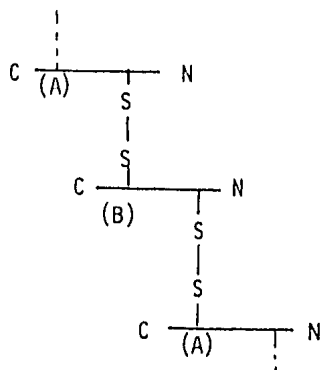


Fig. No. 7

Esta enzima activada cataliza el desdoblamiento del coagulógeno en subunidades de polinéptidos, Fig. No. 8





Matriz proteínica del gel por
enlaces cruzados disulfuro. (27)

Fig. No. 8

La naturaleza química del coagulógeno y de sus subunidades fué estudiada en el *Tachypleus tridentatus*, una especie de cangrejo en herradura encontrado en el mar de Japón que tiene la misma respuesta a la endotoxina que el *Limulus*. En este estudio las subunidades de coagulógeno se denominan cadenas A, B, C, de las cuales las cadenas A y B están interconectadas por enlaces disulfuro formando el coágulo. La cadena C, liberada de la porción interior de la molécula madre, no se incorpora al coágulo.

(27)

La secuencia de aminoácidos en las cadenas A, C y porción inicial

de la B se muestra en la Fig. No. 9

Se observa que la ruptura del coagulógeno es en las uniones

18 — Thr¹⁹ y Arg⁴⁶ — Gli⁴⁷, éstos dos residuos de arginina son los únicos

presentes o detectados en el coagulogeno y el ataque se realiza en la

terminal COOH de la Arginina. (28)

Secuencia de aminoácidos del péptido C y cadenas A y B derivada del coagulógeno de *Tachypleus*.

H- Ala - Asp - Tre - Asn - Ala - Pro - Ileu - Cis - Leu - Cis - Asp -
- Glu - Pro - Gli - Val - Leu - Gli - Arg - OH

H - Tre - Gln - Ileu - Val - Tre - Tre - Glu - Ile - Lis - Asp - Lis -
- Ileu - Glu - Lis - Ala - Val - Glu - Ala - Val - Ala - Gln - Glu - Ser -
- Gli - Val - Ser - Gli - Arg - OH

H - Gly - Fen - Ser - Ileu - Fen -----Fen - OH

↙ 102 residuos en total.

Fig. No. 9

La reacción de coagulación es dependiente de la concentración de toxina y del tiempo de incubación; el tiempo necesario para formar el floculo se incrementa conforme disminuye la concentración de endotoxina y viceversa (30). Tal como se muestra en la Fig. No. 10.

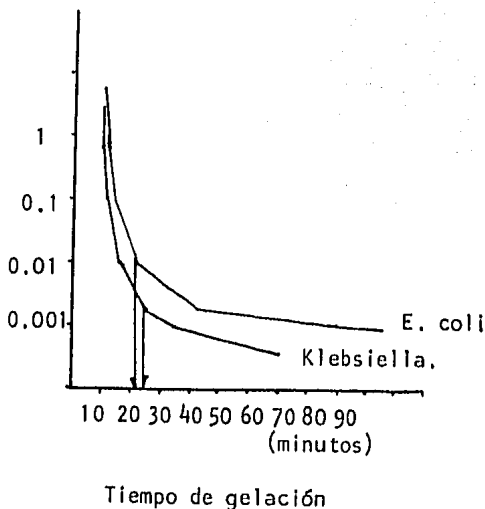


Fig. No. 10

— Protocolo de prueba:

Existen diferentes métodos para la determinación de endotoxinas por el método de L.A.L. el más común por su sencillez y por no requerir equipo automático o sofisticado es el de formación de un gel firme en tubo de ensayo y lectura por inversión del tubo 180° sin perder su integridad.

Todas las operaciones de muestreo y preparación de las muestras deben realizarse en condiciones asépticas utilizando material estéril libre de endotoxina. (27)

El pH de la muestra a ser probada debe oscilar entre 6.0 a 7.5, en caso de no encontrarse dentro de éstos límites es necesario ajustarlo con NaOH 0.1 N ó HCl 0.1 N estéril y libre de pirógenos (en ocasiones se requieren soluciones más concentradas de NaOH o HCl para lograr el pH adecuado sin diluir mucho la muestra). No es necesario ajustar el pH del agua o soluciones salinas.

Es importante observar si en la formulación de la muestra a probar existe la presencia de agentes quelantes, en caso positivo añadir solución de CaCl_2 para evitar inhibición de la reacción. (27)

Para someter un producto por primera vez a la prueba del L.A.L. se requiere determinar si es compatible con la prueba o produce inhibición de la reacción; para comprobar la validez del uso de la prueba en dicho producto es necesario demostrar que no existe inhibición, lo cual se realiza de la siguiente manera:

Es necesaria la preparación de controles positivos y negativos para asegurar que la prueba se realizó de manera adecuada. (27)

Preparación de los controles positivos; se requiere utilizar endotoxina para obtener una reacción positiva con el L.A.L. En México el reactivo de L.A.L. comercial se conoce con el nombre de Pyrogen y contiene endotoxina liofilizada la cual se maneja de la siguiente manera para obtener los controles positivos: Reconstituir la endotoxina de E. coli, añadiendo asepticamente 5.0 ml de agua para inyectables U.S.P. (A.P.I.) al vial que contiene la endotoxina, agitar fuertemente por aproximadamente 30 minutos, y mezclar en vortex a velocidad máxima por lo menos 5 minutos. Preparar 2 series de diluciones una con el A.P.I. utilizada y otra con la muestra a probar según se ilustra en figura No.11

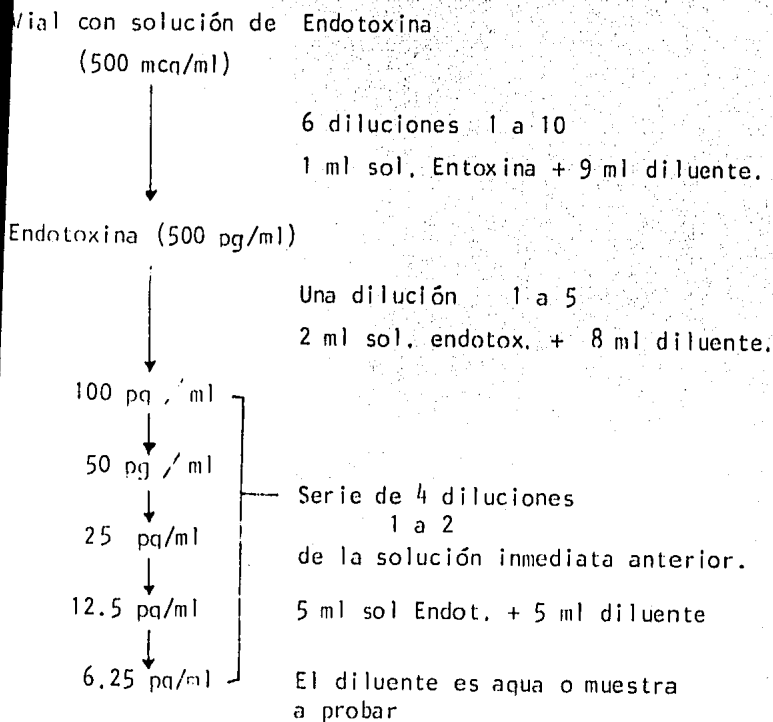


Figura No. 11.

El uso de la solución de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como control positivo en futuras pruebas una vez determinada la compatibilidad del producto asegurará la potencia del producto en el momento de la prueba. La serie de diluciones debe prepararse el día que se va a efectuar la prueba, ya que la endotoxina en solución diluida no es muy estable, la solución de endotoxina de 500 $\mu\text{cg}/\text{ml}$ se puede guardar en refrigeración por 4 semanas de 1 a 5°C garantizando su eficacia.

Los controles negativos son el agua y la muestra a tratar directamente, sin adición de endotoxina y con ajuste de pH o adición de Ca^{++} si fuese necesario.

Una vez preparadas las diluciones se vierten las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por duplicado en tubos de ensayo de 10 x 75 mm rotulados, en cantidades de 0.1 ml y se tapan perfectamente.

Reconstitución del reactivo L.A.L.- Reconstituir el liofilizado de L.A.L. añadiendo 1.2 ml de agua para inyectables U.S.P. al frasco vial de 10 pruebas, ó bien 5.2 ml para la presentación de 50 pruebas. Agitar suavemente 30 segundos cuidando de no hacer espuma.

Una vez reconstituido el lisado pinetear cantidades de 0.1 ml en los tubos de ensayo que contienen las muestras preparadas y los controles.

Dejar incubar cada tubo sin vibración o agitación por 60 minutos \pm un minuto, posteriormente sacar cada tubo cuidadosamente e invertirlo suavemente. Anotar los resultados. (27)

Un resultado positivo se define como un gel firme que mantiene

integridad al ser invertido 180°. (27)

El reactivo comercial está calibrado a dar una respuesta positiva en una hora de incubación a la conc. de 12.5 pg/ml, lo cual deberá ser verificado con él agua sometida a prueba. Si la muestra del producto, libre de endotoxina (control negativo), da un resultado positivo, la prueba es válida y hay que repetirla con un producto no pirogénico, ya que la muestra está contaminada con endotoxina. Si la muestra del producto libre de endotoxina es negativa y las respuestas positivas (puntos finales) de dos series son iguales o se diferencian por no más de una dilución de 2, el producto se considera compatible, (27) un ejemplo se muestra en tabla No. 13.

Conc. Endotoxina	H ₂ O	Resultados				
		(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
100 pg/ml	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
50	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
25	+ +	+ +	- -	+ +	+ +	+ +
12.5	+ +	- -	- -	+ +	+ +	+ +
6.25	- -	- -	- -	+ -	+ +	+ +
3.12						+ -

Tabla No. 13

- Resultado Positivo
- Resultado Negativo
- Producto compatible.
- Producto no compatible (inhibe).
- Producto compatible.

- (D) Es conveniente realizar una dilución más y probar; si en la sig. dilución no existe reacción el producto es compatible.
- (E) Producto no compatible. (Activa)

Es importante el no dejar incubando por un período mayor o menor los tubos de reacción, ya que a menor tiempo de incubación no se detectan las concentraciones límite, obteniendo falsos negativos; a mayor tiempo de incubación se obtienen resultados positivos con concentraciones menores a las esperadas originalmente observando falsos positivos. (30)

Para inyectables de bajo volumen de aplicación no es conveniente analizarlos directamente, ya que por la alta sensibilidad del método se rechazarían productos los cuales estarían lejos de producir una respuesta pirogénica al ser inyectados en el humano, para evitar este problema se recomienda diluir el producto con agua para inyectables U.S.P., la cual se ha demostrado que no contiene concentraciones detectables de endotoxina por el método de L.A.L.) (29), una dilución máxima se puede realizar en función de la cantidad máxima de endotoxina a aplicar por dosis máxima humana o en conejo y por la sensibilidad del reactivo de L.A.L. a utilizar; esto se calcula de la siguiente manera:

- (1) Cálculo de la Concentración Mínima Válida

$$CMV = \frac{\lambda \cdot M}{K}$$

λ = Sensibilidad del reactivo de L.A.L. en unidades de endotoxina (UE) por ml o bien a pg/ml.

M = Dosis en conejo ó dosis máxima humana (dosis por Kg de peso) que puede ser administrada en un período de una hora; la que sea mayor de las dos.

K = 5.0 UE/Kg ó 1.0 ng/Kg (límite de la F.D.A.) (22), (31), (40).

(1 UE = 0.2 ng endotoxina E. coli EC-2).

(2) Cálculo de la Máxima Dilución Válida (31) (29).

$$MDV = \frac{\text{Potencia del producto}}{CMV}$$

Para medicamentos administrados en forma de polvo o granulado la potencia se expresa en mg o unidades por ml; para medicamentos administrados en base a volumen por Kg, la potencia es igual a 1.0 ml/ml (31) reduciendo las expresiones anteriores a una sola fórmula obtenemos:

$$MDV = \frac{C (\text{conc. fármaco}) \times 5 \text{ UE/Kg (límite)}}{\lambda (\text{sensibilidad reactivo}) \times M (\text{Dosis Máxima/Kg})}$$

El valor numérico de la MDV es el número de partes de A.P.I. que hay que añadir a una parte del problema, por ejem:

$$\text{Si } C = 50 \text{ mg/ml.}$$

$$M = 15 \text{ mg/Kg.}$$

$$\lambda = 0.2 \text{ UE/ml.}$$

$$MDV = \frac{C \times K}{\lambda \times M} = \frac{50 \text{ mg/ml} \times 5 \text{ UE/Kg}}{0.2 \text{ UE/ml} \times 15 \text{ mg/Kg}} = 83$$

Por lo tanto para este ejemplo se debe diluir una parte del problema con 83 partes de A.P.I. (31).

Es conveniente para un medicamento de bajo volumen de aplicación

el diluirlo aplicando la MDV y así probar su compatibilidad, como se mencionaba anteriormente; es necesario repetir la prueba de compatibilidad en 3 lotes (según FDA) (31) ó 5 lotes (según S.S.A. (No oficial en medicamentos)) haciendo de esta manera válida la aplicación de la prueba de L.A.L. para dicho medicamento.

En la tabla No.14 se presentan los principales problemas en la determinación de la compatibilidad por fallas técnicas, con sus respectivas acciones que se recomiendan para solucionar cada uno de los problemas.

COMPATIBILIDAD DEL PRODUCTO - INTERPRETACION DE RESULTADOS

Tipo s.	Control Aqua Posit .	Control Muestra Posit .	Control Aqua Negat .	Resultado(s)	Acción Recomendada
	Gel firme	Gel Firme	No Gel	Pruebas según esperado	Proceder a ensayar las muestras.
	Gel Firme	No Gel	No Gel	Prueba inhibi- da por la mues- tra.	Observe control muestra positiva a los 90 y 120 minutos, para esta- blecer grado inhibi- ción.
	No Gel	No Gel	No Gel	1. Actividad del LAL des- truída. 2. Incorrecta preparación- de la Endoto- xina. 3. Agua utili- zada para re- constituir el L.A.L. está- contaminada. Determinar ob- servando el reconstituido si hay gránulos o grumos.	1. Observar 90 v 120min para determinar gra- do de efecto. 2. Repetir procedi- miento completo in- cluyendo preparación v dilución de endoto- xina. Si persiste re- sultado negativo so- licitar ayuda técnica. 3. Desechar reactivo L.A.L. reconstituido. Utilizar agua esté- ril USP comercial pa- ra todas las recons- tituciones de LAL.
50	No Gel	Gel Firme	No Gel	1. Técnica in- correcta. Muestra conta- minada o inco- rrecta prepa- ración de la endotoxina. 2. No inhibi- ción.	1. Observar Control agua positivo durante 90 y 120 minutos. 2. Repetir técnica completa. 3. Si persiste resul- tado negativo contac- tar proveedor.
50			Gel Firme	Contaminación del Control agua negativo.	Repetir técnica com- pleta con meticulo- sidad en cuanto a asencia.

Tabla No. 14

Otros problemas de inhibición (algunos ya mencionados) tienen 3 genes y sus soluciones son las siguientes:

<u>Origen</u>	<u>Solución</u>
Afecta el LAL (Enzima)	Diluir o Ajustar pH
Endotoxina	Uso de Agente dispersante
Formación del gel por complejación del Ca^{++}	Adición de CaCl_2 libre de endotoxina.

El agente dispersante es una sustancia que interacciona con la endotoxina orientando la parte reactiva de la molécula hacia el medio, evitando la formación de micelas, las cuales tienen en su interior la fracción lipídica, la cual posee la acción pirogénica, lo anterior se muestra en figura No. 12.

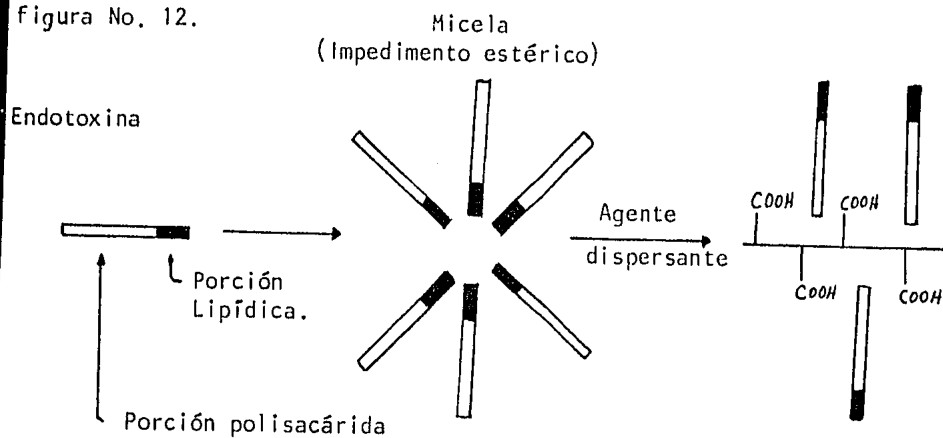


Figura No. 12.

Lo anterior es una forma de disgregar endotoxina, existen otras

formas como son:

Agitación en vortex.

Utilizando ultrasonido.

Observar que la concentración de electrolitos sea baja (ya que precipita la endotoxina).

(29)

El método de la formación del gel firme (coágulo) tiene como desventajas el no ser cuantitativo (es semicuantitativo); la lectura del gel es delicada; requiere un tiempo relativamente largo de incubación con respecto a otros ensayos enzimáticos; y la variación que existe de técnico a técnico. (29)

Otros métodos de detección de endotoxinas por LAL los cuales se diferencian por distintos mecanismos de apreciación de la reacción positiva del L.A.L. son :

a) Una prueba por turbidimetría, el LAL al reaccionar con la endotoxina da como resultado un agregado de proteína el cual imparte turbidez al medio, este incremento de turbidez es determinado en un espectrofotómetro a 360 nm y su absorbancia comparada contra una curva estándar preparada previamente, tiene como ventaja ser cuantitativo, existiendo menor variación de resultados con respecto a la prueba por formación del gel, es un magnífico método; sin embargo, también requiere de un tiempo de incubación de 1 hora y tiene algo de variación de técnico a técnico.

b) Otro método, centrifuga el producto de la reacción de LAL y endotoxinas, al sedimento se le añade un reactivo para proteínas, y se lee al espectrofotómetro; la ventaja es ser cuantitativo y no requerir observar un gel. Las desventajas son: pasos adicionales, más tiempo, más instrumentos de trabajo, reactivos de vida corta, variabilidad de los resultados. (29)

c) Un tercer método se basa en la propiedad de producir un color al producto de la reacción por la adición de un grupo cromóforo al reactivo, el cual es incoloro al estar sin reaccionar y amarillo después de producirse la reacción; su ventaja es ser un método cuantitativo, automático, requiere 20 minutos de incubación.

un menor tiempo de procesamiento, se lee en equipos automáticos eléctricos; su desventaja es el equipo especializado que se requiere. (14) (29)

sibilidad

Se determinó la sensibilidad del LAL a endotoxinas purificadas de E. coli y Klebsiella sp.. Fué observada la velocidad de gelación y el incremento de la viscosidad de mezclas de incubación para soluciones de 0.001 a 1.0 mcg/ml de endotoxina de E. coli y 0.00025 a 1.0 mcg/ml de endotoxina de Klebsiella sp., la endotoxina de Klebsiella sp. fué más rápida que la de E. coli en producir gelación del LAL. (8) (tabla No. 15).

Sensibilidad de LAL a endotoxina de E. coli. y Klebsiella.

Concentración de endotoxina (mcg/ml)	Tiempo de gelación (minutos)	
	E. coli	Klebsiella
1.0	9	9
.1	13	12
.01	22	16
.001	90	31
.0001	-	140

Tabla No. 15

La velocidad de gelación y el incremento en viscosidad fué proporcional a la concentración de endotoxina (8), corroborando lo mencionado en la página número 48, (observar la gráfica reportada en ésta página que las flechas indican los tiempos de incubación en que se forma el firme a concentraciones pirogénicas DE₅₀ (8).

En la tabla número 16 se muestra la sensibilidad actual del reactivo LAL después de una hora de incubación a 37°C.

Tabla No. 16

Endotoxina	Sensibilidad pg/ml
<u>E. coli</u>	25
<u>S. minnesota</u>	50
<u>S. typhimurium</u>	50
<u>S. flexneri</u>	50
<u>S. enteritidis</u>	10
<u>S. marcescens</u>	10
<u>K. pneumonia</u> (ref. FDA)	140
<u>E. coli</u> (referencia propuesta FDA)	62

Comparando la sensibilidad del LAL de esta tabla (0.02—0.14 ng/ml) con la reportada en conejos la página No. 32 (0.55—3.5 ng/ml/kg) se observa que el LAL es al menos 10 veces más sensible que la prueba en conejo. (27)

La sensibilidad de la prueba de Limulus y la prueba en conejo no puede ser comparada directamente, se requieren ciertas condiciones para que sea válida la comparación. La respuesta pirogénica en el conejo depende de la cantidad de pirógeno inyectado por unidad de peso del animal, por lo tanto la sensibilidad de la prueba es dependiente de la dosis. En contraste la sensibilidad de la prueba de Limulus es esencialmente dependiente del tiempo de incubación y la concentración de endotoxina. Por consiguiente cuando se compara la sensibilidad de ambas pruebas a una concentración determinada de endotoxina, el volumen en la prueba de conejo y el tiempo en la prueba de limulus deben de permanecer constantes. El volumen no es una variable en la prueba de limulus porque este es designado a un valor constante, generalmente de 0.1 a 0.2 ml. (10)

Las endotoxinas detoxificadas no producen gelación con el L.A.L. (8)

Ventajas, desventajas y limitaciones.

Una de las características de la prueba de L.A.L. es su especificidad por lo cual la reacción es activada solo por endotoxinas. Si bien las endotoxinas no son los únicos agentes pirogénicos, las endotoxinas son los pirógenos que preocupan a la industria farmacéutica (12)(24)(27) en la fabricación de inyectables; las otras fuentes de pirogenicidad (química o partículas) pueden ser controladas siguiendo métodos de fabricación cuida-

tos (BPM) (GMP'S); pero las endotoxinas son difíciles de eliminar porque resisten la degradación por esterilización con vapor y no se eliminan tampoco por los medios normales de filtración; lo más importante es que la endotoxina es ubicua por naturaleza, por lo que todas las superficies y el agua no tratada deben considerarse en principio como pirogénicas. Las bacterias Gramnegativas crecerán en las soluciones con un mínimo de nutrientes, tales como el agua almacenada después de destilada y deionizada. Generalmente no es económico, y en ocasiones físicamente imposible, el remover la contaminación pirógena una vez que se encuentran presente en la formulación. (27)

La prueba de Limulus es altamente reproducible. Los puntos finales fueron reproducidos en 49 de 50 pruebas in vitro que fueron repetidas una o más veces; los frascos viales con el lisado liofilizado comercial ofrecen uniformidad de respuesta para realizar la prueba. (30)

Se ha empleado la prueba de Limulus para determinar el papel de la endotoxina en reacciones adversas que se presentaron posteriormente a la administración de medicamentos en el fluido cefalorraquídeo. Con frecuencia se presentó meningitis aséptica en pacientes después de una inyección intratecal de radiotrazadores. En un período de 15 meses se observaron 39 reacciones adversas asociadas a ^{131}I -MSA ó ^{111}In -DTPA, diez muestras de lotes específicos de éstos medicamentos implicados en 20 de estas reacciones fueron probadas con L.A.L., todas las muestras reaccionaron en forma fuertemente positiva. La prueba en conejo (menos sensible) fue negativa cuando se probó en base a dosis por peso corporal, sin embargo en dosis a niveles elevados se observó respuesta en conejos; estos da

olician que la causa de las reacciones fué debida a endotoxina que
 naba las soluciones, de lo que se concluye que la prueba de L.A.L.
 magnífica alternativa a la prueba oficial en conejos (25) para es -
 dicamentos de aplicación intratecal por la menor sensibilidad de
 nejos. (10)

Después de más de una década de aplicación de la prueba de L.A.L.
 n indicador de pirógenos, se ha considerado como una medida segura
 trol de calidad para los parenterales debido a su sensibilidad, sim -
 ad, especificidad y reproducibilidad. (14).

Un estudio de Travenol Laboratories señala que: a) Los pirógenos
 ortancia en parenterales de gran volumen y utensilios, son endotoxi -
 as cuales dan respuesta positiva en L.A.L. y conejos); b) Nunca se
 un resultado negativo en LAL y positivo en conejo; c) Algunas
 xinas pirogénicas detectables por LAL no fueron detectadas por la
 en conejo; d) En algunos casos, la prueba oficial de la U.S.P. fa -
 icialmente en la detección de pirógenos, en algunos casos más tarde
 nfirmada la presencia de pirógenos con conejos; pero siempre fué de -
 la y confirmada por la prueba de L.A.L.

Se concluye que es más conveniente la aplicación de la prueba de
 debido a la relativa insensibilidad de los conejos a la endotoxina,
 ativamente con el posible pero raramente observado caso de pirógenos
 gen diferente a endotoxinas (24). Este estudio corroboró que la
 de LAL da una magnífica especificidad a endotoxinas con una varia
 onsiderablemente menor que en el sistema de animales; así como tam -

se obtuvo un resultado favorable en la economía de tiempo y dinero.

Los agentes para quimioterapia del cáncer son un tipo de medicamentos que presentan una alta incidencia de efectos adversos cuando la presencia de pirógenos es sospechada. La prueba de L.A.L. para estos agentes es necesaria debido a: 1) Presentación de reacciones febriles posteriores a su administración, 2) existe la evidencia de potenciación entre los agentes antitumor y las endotoxinas. Se citan como ejemplo de reacciones adversas a la terapia con L-Asparaginasa la aparición de fiebre, náusea, vómito, cambios hematológicos; estas reacciones son debidas en parte a contaminación con endotoxina (10). Desde luego, el pirógeno es un contaminante preservado en L-Asparaginasa porque esta enzima antileucémica es preparada a partir de *E. coli* o *Erwinia* sp. (10)

Se reportaron datos de toxicidad en 300 pacientes que recibieron una dosis de 5 000 U.I./Kg de L-asparaginasa diariamente por algunas semanas. Las reacciones fueron atribuidas a la endotoxina, hipersensibilidad, y a la actividad enzimática de la L-asparaginasa. En general, las respuestas febriles en éstos pacientes tuvieron buena correlación con la respuesta en conejo cuando se aplicó una dosis inferior (por seguridad) por Kg de peso corporal, administrando 200% 1000 U.I./Kg. sin embargo la prueba de pirógenos en conejo puede no ser la elección apropiada este medicamento debido a que el conejo es una de las especies remarcadamente susceptible a efectos tóxicos. Los estudios iniciales con *Limulus* indicaron que concentraciones de endotoxina de 10-100 ng por 1000 U.I. de enzima asociadas a letalidad en conejos (25). Las preparaciones comunes de

Las asparaginasa derivadas de *E. coli* o *Erwinia* contienen 0.1 a 4 ng de endotoxina por 1000 U.I. cuantificadas por la prueba de L.A.L., por lo tanto se aplicaron técnicas de purificación monitoreando por L.A.L., reduciendo los niveles de endotoxina a concentraciones seguras, con esto las reacciones adversas disminuyeron. (10)

La fuente de contaminación pirogénica de albúmina radioiodada fue rastreada hasta detectarla en una resina intercambiadora de iones utilizada en la purificación del radiofármaco. Utilizando L.A.L. se determinaron niveles de microgramos de endotoxina que fueron expulsados—solo al inicio del proceso—al exterior por lavado. (25)

Existen reportes de resultados falsos negativos observados en la prueba de L.A.L. (20) (30), pero estos se están corrigiendo con adición de agentes que evitan la inhibición del L.A.L. por sus diversos mecanismos.

La limitación principal de la prueba de L.A.L. es su insensibilidad a productos pirogénicos distintos a las endotoxinas bacterianas, por lo tanto este tipo de contaminación no será detectada.

Entre la contaminación que produce una respuesta pirogénica podemos citar algunos pirógenos exógenos y su probable mecanismo de inducción de pirógeno endógeno (35); los cuales se encuentran en la tabla No. 17.

Pirógeno Exógeno	Características Fisicoquímicas	Posible mecanismo de inducción de pirógeno endógeno.
Agentes Infecciosos Virus (vivos)	Recubrimiento proteínico Acidos nucleicos	Antigénico Infección celular
Bacterias (vivas o muertas) Grampositivas Gramnegativas	Acidos teicoicos Peptidoglicanos Partículas Peptidoglicanos Lipopolisacáridos Partículas	Toxicidad?; antigénico toxicidad? Fagocitosis toxicidad? toxicidad Fagocitosis
Hongos (vivos/muertos)	Carbohidratos complejos Proteínas termoestables Partículas	Toxicidad?, antigénico Antigénico. Fagocitosis
Productos Bacterianos Lipopolisacáridos Exotoxina estreptococal Enterotoxina estafilococal Proteínas de estafilocos	Lipido A Polipéptido Polipéptido Lábiles en medio alcalino, estables en medio ácido.	Toxicidad Toxicidad, antigénica Toxicidad antigénica Antigénicas
Tuberculina; PPD	Proteína	Antigénica
Productos Fúngicos Complejo polisacárido (Criptococal)	Polisacárido	Toxicidad, antigénico
Proteínas criptococales	Proteínas termoestables	Antigénica
Agentes no microbianos Sero albúmina humana Complejos solubles Gamma globulina bovina Bencilpenicilina G	Proteína Ag-Ac I Proteína Proteína Anillo beta-lactámico	Mediado por anticuerpo Consumo de complemento Mediado por linfocito Mediado por anticuerpo
Esteroides Pirogénicos Etiocolanolona 3 Beta androstano-3-alfa-ol-17-ona. 3-Beta-pregnano-3-alfa-ol-20-ona.	Esteroides C 18 Esteroides C 18 Esteroides C 21	? ? ?
Agentes Farmacológicos Polilipol C Bleomicina	Polinucleótidos Polipéptido	? ?, Inhibición de la D.N.A. transferasa. ?, prevención de la formación de microtubulos.
Colchicina	Alcaloide	
Adyuvantes sintéticos Muramyl dipeptido	N-Acetylmuramyl-l-alanyl-d-isoglutamina.	? Toxicidad.

Sin embargo, algunos investigadores han reportado sustancias que den dar una respuesta positiva en la prueba de L.A.L. bajo determinadas circunstancias (12), destacan los Peptidoglicanos, exotoxinas de estreptococos, trombina, polinucleotidos, ácidos lipoteicoicos y dextranas sintéticas; sin embargo, en estos ejemplos es general que para obtener la respuesta positiva se requiere una alta concentración de la sustancia comparada a la cantidad de endotoxina que detecta el reactivo. Los resultados publicados son los de la tabla No. 18.

Sustancia	Punto final de la endotoxina	Punto final de la sustancia
Peptidoglicanos		
Streptococos grupo A	0.0005 mcq/ml	400 mcq/ml
Safilococo aureus	0.0005 mcq/ml	75 mcq/ml
Safilococo epidermidis	0.0005 mcq/ml	200 mcq/ml
Exotoxina estreptococal	0.001 mcq/ml	100 mcq/ml
Streptococal A	0.001 mcq/ml	100 mcq/ml
.. B	0.001 mcq/ml	100 mcq/ml
.. C	0.001 mcq/ml	100 mcq/ml
Trombina	0.01 mcq/ml	10 unid/ml
Emboplastina	0.01 mcq/ml	10 unid./ml
Poli A: Poli U	0.01 mcq/ml	1000 mcq/ml
Poli I: Poli C	0.01 mcq/ml	1 mcq/ml
Ácidos Lipoteicoicos	0.000065 mcq/ml	
..T. intracelular	0.000065 mcq/ml	0.05 mcq/ml
..T. extracelular	0.000065 mcq/ml	0.10 mcq/ml
..T. pared deacilada	0.000065 mcq/ml	5.0mcq/ml
Dextranas sintéticas	6.3 mcg /0.1 ml	100 mcq/0.1ml
Dextran fosfato	6.3 mcg /0.1ml	100 mcq/0.1ml
Dimethyl Dextran	6.2 mcg /0.1ml	100 mcq/0.1 ml
Fosfato		

Tabla No. 18

Es necesario observar que estas sustancias han sido también probadas en conejos obteniéndose respuestas pirogénicas en los mismos. (12)

Tabla 19.

Sustancias que causan reacción positiva en L.A.L. y/o Conejos.		
Substancia	Reacción L.A.L.	Inducción Febril
Poli I: poli C	+	+
Trombina	+	+
Tromboplastina	+	+
Peptidoglicano	+	+
Exotoxinas estreptococales	+	+
Dextranas sintéticas	+	+
Ácidos Lipoteicoicos	+	N
Ácidos teicoicos	N	+

N = No probados.

(12)

Tabla No. 19

Fallas técnicas más frecuentes y su solución.

Es necesario seguir exactamente el protocolo señalado para la prueba, ya que al incurrir en determinadas fallas técnicas éstas se tornarán en un resultado falso negativo o falso positivo.

— Las fallas técnicas más comunes y su solución son las siguientes:

Resultados falsos negativos.— No hay nel donde se esperaba encontrarlo:

dispersión de la endotoxina.

Las endotoxinas utilizadas como controles positivos son altamente purificadas y su comportamiento en soluciones acuosas es característico de sustancias con una porción hidrofílica y otra lipofílica por lo cual tienden a aglutinarse (formando micelas), al realizar diluciones de endotoxinas (para obtener las conc. deseadas en los controles positivos) debe asegurarnos que al tomar las muestras, la endotoxina se encuentre bien dispersada, esto se logra con una agitación vigorosa o por adición de adecuados dispersantes. Además es conveniente no realizar diluciones mayores de 10 para garantizar que la concentración de endotoxina sea la adecuada en las subsecuentes diluciones, así como también es necesario atenerse estrictamente a los tiempos de agitación indicados en los protocolos de los productos comerciales.

precisión del pipeteo.

Aunque la prueba de L.A.L. es semicuantitativa (en el caso de control firme), es conveniente el uso de pipetas y matraces volumétricos, para con esto disminuir las fuentes de error ya que el método es bastante sensible a pequeñas cantidades de endotoxina y si el pipeteo no es el adecuado o no están bien graduadas las pipetas va a repercutir en variaciones en el punto final.

incubación.

La temperatura de incubación es de 37°C, el equipo utilizado para este fin no debe fluctuar más allá de $\pm 1^\circ\text{C}$ por el período de 1 hora durante la prueba. La temperatura de 37°C debe tenerla en el interior del tubo el material líquido, esto se verifica introduciendo en la gra

la un tubo de las mismas dimensiones con un termómetro y agua a cubrir el bulbo únicamente, verificando si las condiciones antes señaladas se cumplen; es conveniente en baños maria el uso de gradillas con el fondo perforado.

Durante su formación el gel es bastante frágil y puede ser roto irreversiblemente por golpe mecánico o vibración, por lo cual no deben utilizarse equipos de agua circulante o colocarse en lugares donde exista vibración.

Técnica de lectura

Es necesario observar cuidadosamente la técnica de lectura, se considera como resultado positivo aquel gel que mantiene su integridad al invertirlo 180°, al leer no se debe parar a los 45° ó 90° y la persona cargada de leer no debe tener un pulso alterado (tembloroso), ya que esto puede ocasionar la ruptura de un gel característico de una respuesta positiva, se requiere tener cuidado al tomar los tubos de no golpear a los adyacentes.

Al añadir el reactivo L.A.L. al producto a probar se debe agitar hasta homogenizar la solución, ya que de no ser así se puede formar un gel firme solo en la parte inferior de la solución.

Cuidados a los reactivos de L.A.L.

El reactivo liofilizado es muy estable si se mantiene en refrigeración y sin exposición a la luz entre 1-5°C. Al reconstituirse su manejo y almacenaje debe ser similar al de cualquier producto biológico frías.

El agua de reconstitución del reactivo no debe contener agentes bacteriostáticos ya que podrían inhibir la futura reacción; debe tener características de esterilidad y apirogenicidad; la prueba oficial en conejo no es criterio suficiente para aceptar el uso del agua en la prueba de L.A.L., el uso de agua contaminada con endotoxina puede dar resultados falsos positivos o negativos; en caso de contaminación bacteriana, puede aumentar la concentración de la endotoxina en el control positivo o modificar el punto final.

El material de trabajo debe estar perfectamente limpio y libre de endotoxina, utilizando además una técnica aséptica de manejo.

El lisado reconstituido se mantiene estable por una hora a temperatura ambiente, un día a 5°C o 4 semanas a -10°C (sólidamente congelados). No se debe incubar previamente el lisado en los tubos antes de la prueba ya que puede causar pérdida en sensibilidad.

La endotoxina de E. coli reconstituida no debe de congelarse, solo almacenarse de 1 a 5°C, una solución de 500 mcg/ml puede conservarse hasta por 4 semanas y una de 2 ng/ml hasta por 1 semana.

Algunos tipos de plástico han mostrado tener afinidad a las endotoxinas, por lo cual su uso durante la prueba se debe realizar con precaución.

-Inhibición.

Los protocolos de prueba de los proveedores del L.A.L. muestran técnicas para determinar si existe inhibición y si la hay, las formas más comunes de corregirla; Las soluciones más comunes son: ajuste de pH

ón de agentes dispersantes, adición de Cloruro de calcio etc.

Resultados falsos positivos. -Gel firme donde no se esperaba encontrarlo.

La gran sensibilidad del L.A.L. es considerada como una de sus ventajas, pero puede ser fuente de algunos problemas.

En cualquier superficie o sustancia que pueda estar en contacto con el L.A.L. o con la muestra, debe estar libre de endotoxinas, hay que recordar que la endotoxina está virtualmente en todas partes de la naturaleza, y al entrar en contacto con el L.A.L. aun en muy pequeñas cantidades es susceptible de inducir la reacción.

Como la prueba es más sensible que la del conejo, los productos que pasan la prueba en el conejo pueden dar reacción positiva por L.A.L. por lo cual se recomienda utilizar controles positivos y negativos para verificar si la técnica empleada fué la adecuada; al obtener un gel firme por L.A.L. debe asumirse la presencia de endotoxina.

Comparación de diferentes lisados comerciales

Análisis de los lisados comerciales que se venden a nivel internacional. En México se vende exclusivamente el reactivo de Mallinckrodt, los demás se adquieren exclusivamente por importación, sus principales características se revisan a continuación para la elección del más apropiado de acuerdo a las necesidades del laboratorio.

Como se muestra en la tabla No. 20 los productos en viales múltiples son en general 5 a 20 veces más sensibles que los vendidos en viales -

es para una prueba. (36)

La calidad del gel formado es un factor importante para la determinación del punto final. En general, los viales multiprueba forman un gel firme, permitiendo una buena diferenciación entre los tubos positivos y negativos esto es, ya sea que el lisado de un gel firme o bien que no forme ningún gel. Los viales de pruebas simples forman geles frágiles lo cual dificulta la determinación de los puntos finales. (36)

Fuente del L.A.L.	Sensibilidad a endotoxina de E.Coli (ng/ml)			Calidad del gel en el punto final	Precio por vial en Dls.
	Inicial	después de Almacenar			
Vial prueba sencilla. Microbiological Associates	0.3			nobre	5.01
Difco	0.3			pobre	3.74
Vial Multiprueba Mallinckrodt	0.03	0.02		buena	3.10
Sigma Chemical	0.06	0.3		buena	2.00
Difco	0.06	0.06	.08	buena	1.60
Associates of Cape Cod	0.04	0.04		buena	0.75

Almacenado en las condiciones recomendadas por cada fabricante. (36)

Tabla No. 20

El precio por prueba varía ampliamente, como se esperaría el precio por vial para una sola prueba es mayor que para los viales multiprueba, sin embargo, el precio por prueba en los multiprueba varia ampliamente desde 0.75 U.S. hasta \$3.10 (36)

Al 27 de mayo de 1985 el precio en México del L.A.L. de Mallinckrodt era de \$ 106,924.00 y \$ 32,732.00 (más 15% IVA) para 250 y 50

pruebas respectivamente, variando el costo por prueba de \$ 491.85 a \$ 752.84 (incluyendo IVA).

La sensibilidad a diferentes endotoxinas es similar en los distintos reactivos como se observa en la tabla No. 21.

Fuente del L.A.L.	Endotoxina (ng/ml)					
	E.coli	S.typhosa	S.marcescens	S.flexneri	P.mirabilis	pseudomonas spp.
Vial prueba sencilla						
Microbiological Associates	0.3	0.4	0.5	0.5	700	30
Difco	0.3	0.1	0.3	0.3	200	20
Vial multiprueba						
Mallinckrodt	0.03	0.04	0.06		30	80
Sigma Chemical	0.06	0.04	0.06	0.06	30	50
Difco	0.06	0.04	0.06		40	10
Associates of Cape Cod	0.06	0.06	0.08	0.08	100	500

Tabla No. 21

Diferencias primordiales en los protocolos de prueba, condiciones de almacenaje, preparación de equipo, etc.

Comparación de reactivos de LAL comerciales

	Pyrogen	Pyrogel	Pyrotell TM Pyroquant.	N.N.
Preparación del equipo	1 h a 250°C	2-4 ha 210°C	3 h a 180°C 1 h a 250°C	autoclave 3 h a 175°C
Preparación de la Endotoxina estandar	disolver en agua libre de pirógenos 1 h en Vortex	disolver en agua libre de pirógenos 10 min en Vortex	disolver en agua libre de pirógenos 10-60 min en Vortex	Presentado como solución.
Almacenamiento	2-6°C, 4 semanas.	2-8°C, conc > 1 ng/ml: 14 días en refrigeración	5°C, 4 semanas	
Preparación de el LAL	reconstituir con agua	reconstituir con agua	reconstituir con agua	Presentación como solución.
Almacenamiento	Más de 24 h a temperatura ambiente -15°C, 4 semanas. En tubos de prueba de 10 x 75 mm.	Más de 8 h. en hielo; -20°C, 2 semanas	A 5°C, 1 semana; -20°C, 4 semanas.	1 año < 0°C Congelado
Procedimiento de prueba.	En tubos de prueba de 10 x 75 mm.	En tubos de prueba de 10 x 75 mm.	En tubos de prueba de 10 x 75 mm.	En tubos de prueba de 10 x 75 mm.
Muestra	pH 6-7.5	pH 6.75-7.5	pH 6-8	pH 6-8
Prueba	0.1 ml. muestra + 0.1 ml LAL	0.1 ml muestra + 0.1 ml LAL	0.1 ml. muestra + 0.1 ml. LAL	0.1 ml. muestra + 0.1 ml. AL.
Incubación	a 37°C. 60 min.	37°C + 2 °C, 60 min.	37°C + 0.5°C 60 min.	37°C 30, 60 min; 2-4 h, -18 h.
Lectura	gel	gel	gel	gel
Endotoxina Estandar	E. coli Serie de diluciones 1,0-0.015 ng/ml.	E. coli Serie de diluciones 1,0-0.015 ng/ml	E. coli De acuerdo a datos o serie de diluciones 1,0-0.0008 - ng/ml.	Klebsiella 5 ng.
Sensibilidad del líquido	0.05-0.01 ng/ml	Sensibilidad en niveles -- 0.007-0.120 ng/ml.	Sensibilidad en 5 niveles: 0.008; 0.013; 0.04; 0.05; 0.2 ng/ml	biofiltrados menos sensible que congelado
Vendido por	Byk-Mallinckrodt	Concept	Pyroquant Diagnostik GmbH Associates of Cap-Cod, Inc.	N.N.
Información del	1980	1981	1981	1973/78

D) Estudios comparativos de las pruebas de L.A.L. y respuesta febril en conejo para determinación de endotoxinas.

Debido a las diferentes potencias de endotoxinas y diferentes sensibilidades del L.A.L. y conejos, se han realizado diferentes estudios comparando las pruebas de L.A.L. y conejos.

Cooper encontró que una concentración de 5 ng/ml de endotoxina de *E. coli* producía un gel sólido en 35 minutos, la inyección de 1 ml/Kg de la misma solución a 5 conejos produce la respuesta pirogénica (0.5°C o mayor) en únicamente uno de los cinco conejos. (8)

Una dosis de 1 ml/Kg de endotoxina de *Klebsiella sp.* (0.6 ng/ml) produce una reacción insignificante en tres conejos y 1 ng/ml dió un gel firme en 31 min. (8) Los datos que observaron indican una sensibilidad del L.A.L. al menos 10 veces mayor a la prueba oficial. (8)

En la tabla número 23 se muestra a experiencia adquirida con la aplicación de la prueba de L.A.L. entre diferentes fabricantes de inyectables de pequeño volumen.

Productos totales probados	34
Resultado positivo en L.A.L. sin adición de endotoxina	0
Productos sin diluir que inhibieron la reacción del L.A.L. habiendo añadido endotoxina.	27
Productos que mostraron resultados positivos a L.A.L. después de dilución, añadiendo endotoxina.	30
Productos diluidos que inhibieron L.A.L. habiendo añadido endotoxina.	4
Productos en que el L.A.L. fue equivalente a / ó más sensible a la prueba U.S.P.	30

Tabla No. 23

Al probar 155 radiofármacos y productos biológicos para pirógeno por L.A.L. y conejos, se obtuvieron 130 resultados concordantes, 2 de los resultados no fueron detectados in vitro, 24 pruebas fueron positivas únicamente in vitro, los resultados son los que se encuentran en la tabla - 24.

Productos	%	No. de Pruebas	Pruebas Positivas -	
			por LAL	por Conejo
Albumina Humana	5%	37	1	3
" "	25%	25	7	0
Extracción Proteínica Serumática		12	0	0
Gamma globulina inmune		8	4	0
Sero Antirábico		8	1	1
Sero antihemofílico				
Proteínas precipitadas		5	4	1
Antígenos virales		22	22	17
Radiofármacos radioactivos y de localización		27	9	7
Productos misceláneos		11	2	0
		155	50	29

Lo anterior es indicativo de una muy aceptable correlación entre las pruebas, solo dos de 29 resultados fueron no detectados in vitro, de ellos al utilizar un reactivo más sensible dio el resultado positivo - actualmente este tipo de inhibición se ha corregido por la adición de sales dispersantes de la endotoxina. (30)

J. van Noordwijk realizó un estudio comparando la prueba del L.A.L. y la prueba en conejo según la Farmacopea Europea. Tomó como criterio para otorgar un resultado positivo o negativo en L.A.L. las características mostradas en la tabla No. 25

Descripción	Resultado
Formación de un gel firme adherido al tubo cuando este se inclina.	++
Formación de un gel frágil, en ocasiones granular, el cual se mueve al inclinarse.	+
Sin formación de gel, pero incremento en la viscosidad.	±
Sin modificación en la viscosidad.	-

(20)

Tabla No. 25

Los resultados (+ +) y (+) fueron aceptados como una evidencia de la presencia de pirógenos, el resultado (±) fue señalado como un indicador para repetir la prueba antes de tomar una conclusión definitiva; el resultado (-) fue interpretado como demostración de ausencia pirogénica. (20)

Los resultados que obtuvo comparando estos métodos son los de la tabla No. 26.

Pirógeno		Reacción.		
Origen	Concentración (ng/ml)	Limulus		Conejo
		1 h	2 h	
Endotoxina	50	++	++	+
E. coli	5	++	++	+
Mallinckrodt	5×10^{-1}	++	++	+
	5×10^{-2}	+	+	-
	5×10^{-3}	±	+	-
	5×10^{-4}	-	±	
	5×10^{-5}	-	±	
Endotoxina				
S. marcescens	50	++	++	
proposición para referencia inter- nacional.	5	++	++	
	5×10^{-1}	++	++	+
	5×10^{-2}	+	+	+
	5×10^{-3}	±	+	-
	5×10^{-4}	-	±	-
Endotoxina				
P. vulgaris	50	++	++	+
Proposición para referencia inter- nacional.	5	++	++	-
	5×10^{-1}	+	+	-
	5×10^{-2}	+	+	
	5×10^{-3}	±	±	
	5×10^{-4}	-	-	
	5×10^{-5}	-	-	
Cultivo de				
K. pneumoniae k. 67	50	++	++	+
	5	++	++	+
	5×10^{-1}	±	±	-

En adición al trabajo anterior se prepararon diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} de filtrados de cultivos provenientes de *Aspergillus niger* y de *Saccharomyces cerevisiae*, fueron probados cada uno de ellos. Se obtuvieron resultados negativos en ambas pruebas. (20)

Se probaron muestras de agua y parenterales de gran volumen los resultados resumidos son los de la tabla No. 27.

Prueba	Resultado	No. de reacciones
Limulus	++ ó +	3
	±	2
	-	25
Conejo	+	3
	-	27

Tabla No. 27

En la tabla No. 28 se muestran los resultados obtenidos con algunos parenterales de gran volumen de aplicación.

Composición	Limulus			Conejo	
	++	ó +	±	-	+ -
A) Fluidos originales					
gluconato de calcio (30%)	6	3	4	5	8
NaHCO ₃ (1.4%)	0	1	0	0	1
KCl (0.3%)	0	1	0	0	1
Citrato de sodio (3.8%) buffer	0	2	0	0	2
Solución de Heparina	0	1	2	0	3
Total	6	8	6	5	15
B) Fluidos con 5 nq de endotoxina E. coli					*
Gluconato de Calcio	12	1	0	3	
NaHCO ₃	1	0	0		
KCl	1	0	0		
Citrato de sodio buffer	0	2	0	1	

* Únicamente un pequeño número de estos fluidos fueron probados con conejo

Tabla No. 28.

Al trabajar con antibióticos se obtuvieron los resultados de la tabla No. 29

Composición	Limulus			Conejo	
	++ ó +	±	-	+	-
A) Soluciones originales					
penicilina benzilica (2.4 mg/ml)	0	0	1	0	1
Ampicilina (1.2 mg/ml)	0	0	3	0	3
Tetraciclina HCl (5 mg/ml)	0	0	4	0	4
Tirotricina y belcomicina	1	0	2	0	3
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	1	0	10	0	11
B) Soluciones con 5 ng de endotoxina de E. coli.					
Clorhidrato de tetraciclina	0	0	4	1 *	

* Unicamente una muestra fue probada en conejos.

Tabla No. 29

En la tabla anterior se observa que el L.A.L. dio un resultado falso negativo, se investigó por lo tanto como afectaba su concentración en la inhibición del producto, así como de los iones Ca^{++} y Mg^{++} los resultados se muestran en la Tabla No. 30.

Compuesto	Concentración (mg/ml)									
	100	50	25	10	5	2.5	1.25	1	0.62	0.3
CaCl ₂ · H ₂ O	-	++	++	++	++				++	
MgCl ₂	++	++	++							
Tetraciclina. HCl				-	-	-	-		++	
Oxitetraciclina				-	-	-	+		+	++

En todos los casos se añadió 5 ng de endotoxina de E. coli antes de someterlos a prueba. (20)

Tabla No. 30

Utilizando una solución de glucosa-cloruro de sodio se determinó la sensibilidad en ambos métodos: tabla No. 31

	Directo	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Limulus			++	++	+	+	-
Conejo	+	+	+	?	-		

? = Resultado indefinido en 3 conejos, se requería repetición con otros 3 conejos, lo que no se realizó.

Tabla No. 31

Finalmente se realizaron estudios en preparaciones medicinales y fluidos de origen biológico para inyección, los resultados se encuentran en la tabla No. 32.

Substancia	Dosis en Conejos mg/Kg ml/Kg	Limulus						
		+	+	0	+	±	-	Conejo
							+	-
Hidro cortisona	2.5	2	0	1	0	3		
Dexametasona Acetato	0.8	0	0	4	0	4		
Cortisona	2.0	0	0	3	0	3		
Prednisolona	2.25	1	0	5	0	6		
Metaraminol	0.25	0	0	2	0	2		
Benzotropina metanosulfonato	0.6	0	0	2	0	2		
Amitriptilina	0.5	0	0	2	0	2		
Extracto de hfgado			1	0	2	3	1	4
Proteinas plasmáticas			1	1	2	1	1	3
Polisacarido Neisseria			0.1	3	0	1	2	1

(20)

Tabla No. 32

Wachtel comparó la prueba de la U.S.P. con la prueba L.A.L., determinando inicialmente la curva dosis respuesta a diferentes endotoxinas en conejo, obteniendo la DP_{50} y observando cuantas veces más sensible es la prueba de L.A.L. para cada endotoxina (comparando diferentes productos comerciales de L.A.L.) (36) Tabla No. 33 v Fig. No. 13

Tabla No. 33

Endotoxina	DP_{50} (ng/ml oor kg)
E. coli 0127:B8W	1.04
K. pneumoniae (FDA)	5.0
P. mirabilis	1,600
Pseudomonas spp	3,300
S. typhosa 0901 W	1.38
S. dysenteriae (WHO)	>50

Curva típica de dosis - respuesta para
endotoxina de *E. coli* (O127: B8W)

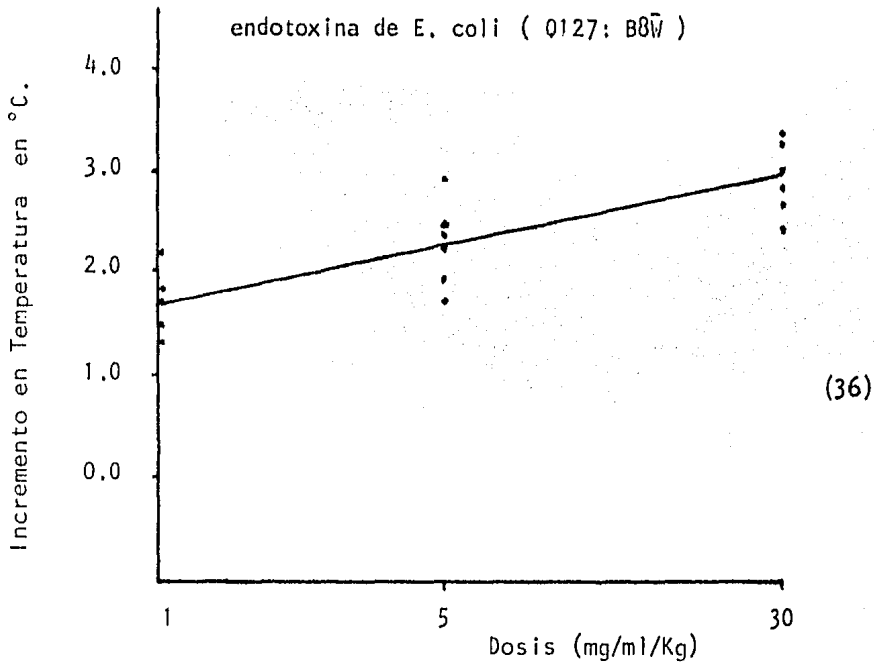


Fig. No. 13

Correlación entre el L.A.L. y la prueba de pirógenos U.S.P.

Fuente del L.A.L.	Endotoxina *			
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhosa</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Pseudomonas</i> spp
Vial prueba sencilla				
Microbiological Associates	3.5	3.5	2.2	100
Difco	3.5	13.8	7.8	166
Vial multiprueba				
Mallinckrodt	34.7	34.5	52.2	41.6
Sigma Chemical	17.3	34.5	52.2	66.5
Difco	17.3	34.5	39.2	332
Associates of Cape Cod	17.3	23.0	15.7	6.7

* Expresado como la proporción entre la DP 50 y el mínimo nivel (36) detectable por L.A.L.

Se observa en la última tabla que hay una muy buena correlación entre un método específico de L.A.L. y la prueba U.S.P.; la proporción de sensibilidad se mantiene esencialmente similar para todas las endotoxinas probadas. Considerando la amplia variación en los límites de confianza en las curvas de respuesta febril utilizados para determinar la DP 50, una diferencia de dos o tres veces en la proporción de sensibilidad es buena dentro de la variación experimental. (36)

Es importante señalar que se reportan resultados publicados en revistas de diferentes años, y los reactivos de L.A.L. comerciales actuales han sido mejorados en sensibilidad y facilidad de determinación del punto final (como se señaló en la sección de sensibilidad), por lo que es necesario tomar en cuenta esto y considerarlo en la interpretación de los resultados.

E) Validación.

Es la determinación del grado de validez de un proceso de medición.

Esta definición sugiere una actividad que se realiza después de que el proceso de medición se ha efectuado, si la evaluación es un éxito, el proceso recibirá confirmación o aprobación oficial.

Un significado alternativo de validación es hacer válido en el sentido de producir el resultado deseado.

Esta definición sugiere una actividad que se realiza mientras el proceso de medición se desarrolla, esto es que, se vaya evaluando cada paso que forma un cierto proceso y encontrar la falla, si es que existe, antes de concluirlo.

CAPITULO III
PARTE EXPERIMENTAL

factos reelevantes de los medicamentos a evaluar.

El presente trabajo de validación se realizó con seis productos farmacéuticos siendo estos: agua para inyectables (como materia prima) y 5 solventes de bajo volumen por dosis: Clorhidrato de Nalbufina (analgésico mayor); Clorhidrato de Naloxona (antagonista de narcóticos); Hidroxocobalamina (Vit B₁₂); Clorhidratos de Tiamina y Piridoxina (Vit. B₁, B₆); y complejo Clorhidrato de tiamina, Riboflavina, Nicotinamida, Clorhidrato de Piridoxina).

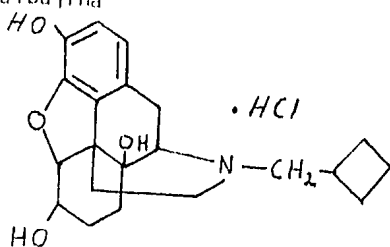
Las formulaciones, pH y dosis por aplicación de los medicamentos seleccionados son las que se encuentran en la tabla No. 35.

Clorhidrato de nalbufina	10 mg
Vehículo cbp	1 ml. pH 3.2 a 4.0
Dosis 1 ml máximo c/3 horas	
Clorhidrato de naloxona	0.4 mg
Vehículo cbp	1 ml pH 3.1 a 3.5
Dosis 1 a 3 ml sin repetición.	
Acetato de hidroxocobalamina	5000 mcg
Vehículo cbp	1 ml pH 3.85 a 4.35
Dosis 1 ml 3 veces a la semana.	
Clorhidrato de tiamina	100 mg
Clorhidrato de piridoxina	50 mg pH 3.5 a 4.1
Vehículo cbp	1 ml.
Dosis 1 ml 3 veces a la semana	
Clorhidrato de tiamina	25 mg
Riboflavina 5 fosfato de sodio	13.7 mg.
Nicotinamida	50 mg.
Clorhidrato de piridoxina	5 mg.
Pantenol	10 mg
Vehículo c.b.p.	10 ml pH 3.65 a 3.95
Dosis 1 a 2 ml diariamente	

Y D) Constituyen un solo producto que se presenta en dos ampollitas por incompatibilidad los cuales se mezclan en el momento de su aplicación.

Acciones farmacológicas de los principios activos.

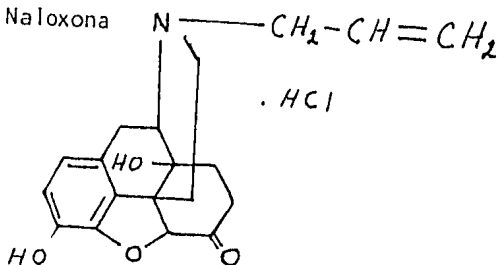
Clorhidrato de Nalbufina



La nalbufina está químicamente relacionada a los opioides, el potencial analgésico equivale al de la morfina mg a mg, su acción analgésica se inicia a los 2 o 3 minutos de una aplicación i.v.; su vida media plasmática es de 5 horas y el efecto analgésico se prolonga hasta por seis horas. (38)

En los resultados de la prueba convencional en conejo se ha observado una consistente disminución en la temperatura, que va de 0.2 a 0.6°C, lo cual nos da idea que afecta el resultado de la prueba, La nalbufina en dosis de 10 mg/70 Kg. (humano) puede causar depresión respiratoria leve o aproximadamente igual a la producida con dosis equivalentes de morfina. (38)

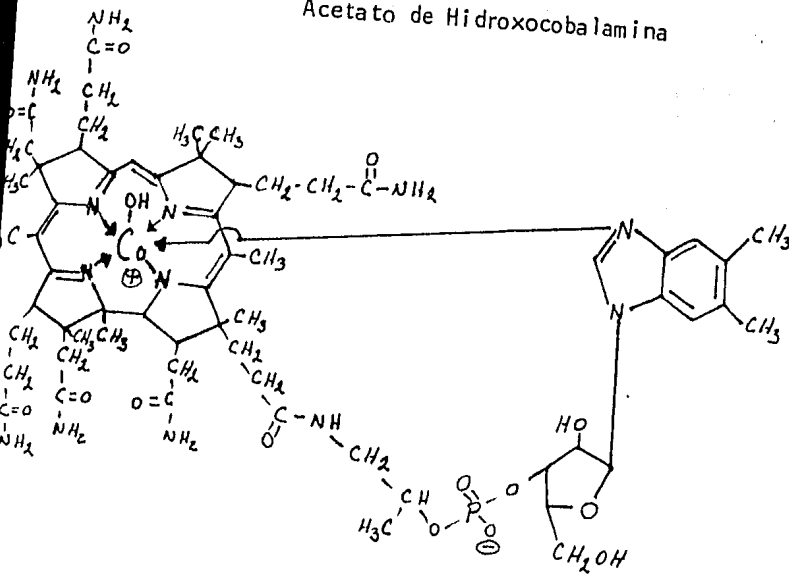
Clorhidrato de Naloxona



La naloxona es el fármaco de elección para tratar la depresión respiratoria en caso de que se sosneche o que se conozca que es causada por una dosis excesiva de narcótico. (38) En pacientes de depresión respi-

ria, hay aumento de la frecuencia de la respiración en términos de uno
 minutos. Desaparecen los efectos sedantes y si la presión arterial
 disminuida, vuelve a cifras normales. La dosis de 1 mg de naloxona
 yra intravenosa bloquea completamente los efectos de 25 mg de heroína.
 efecto antagonista dura de una a cuatro horas según la dosis (39)

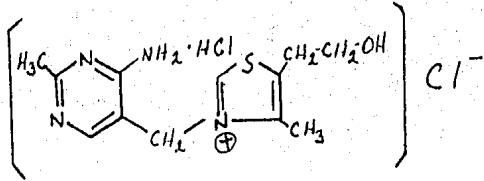
Acetato de Hidroxocobalamina



Las cobalaminas intervienen en muchos sistemas metabólicos en el
 pre. Son esenciales para el crecimiento y la nutrición normales, para
 hematopoyesis normal, para la producción normal de todas las células
 teliales (incluso las del tubo digestivo) y para conservar la mielina
 sistema nervioso. Donde quiera que se efectúe la síntesis de nucleo
 teinas, por lo tanto, en cualquier sitio que las células se reproduz -
 , se necesitará cobalamina, probablemente en cantidad proporcional a
 rapidez de la proliferación celular.

No se ha señalado la aparición de efectos tóxicos con su uso clínico. Los efectos generales incluyen bochornos, cefalea, escalofríos, fiebre, disnea, prurito, urticaria, y choque. (32)

Clorhidrato de Tiamina.



La tiamina carece de acciones farmacológicas cuando se administra en dosis de orden terapéutico. Después de la inyección intravenosa rápida, puede haber ligera vasodilatación y descenso de la presión sanguínea pero este efecto es pasajero. Ni las dosis elevadas ejercen acción sobre la glucosa sanguínea, a pesar de que el papel fisiológico de la vitamina concierne al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono.

Se han observado reacciones tóxicas (32) y algunas reacciones anafilácticas (33) en humanos a dosis de 100 mg diarios por 7 días, existen además al menos 6 casos fatales reportados en la literatura mundial. (34) lo cual hace no confiable aplicar la prueba de pirógenos en conejo a medicamentos con tiamina; sin embargo la experiencia del Reino Unido señala que al administrar intravenosamente dosis relativamente altas del clorhidrato de tiamina con otros componentes del complejo B el riesgo de tal reacción es insignificante. (34)

Nota: El resto de sustancias activas no son mencionadas ya que no tienen importancia desde el punto de vista pirogénico, no presentan problemas.

Implementación de las pruebas.

Para validar la prueba de L.A.L. la FDA pide realizar un estudio comparativo entre la prueba tradicional en conejo y el L.A.L. demostrando con esto correlación entre las pruebas o bien mostrando igual o mayor sensibilidad de la prueba de L.A.L.

En el lugar donde se desarrolló el presente trabajo no se contaba con un Bioterio en funcionamiento, por lo cual en las instalaciones diseñadas con tal fin se adaptó uno que cumpliera todos los requisitos señalados por las autoridades oficiales para realizar la prueba.

Se contaba con una construcción formada por dos habitaciones físicamente separadas entre sí por pared y puerta, a su vez alejadas del resto del laboratorio y localizadas al fondo del mismo en un estacionamiento, siendo un lugar tranquilo y sin perturbaciones evitables. Construido con doble techo, dos ventanas y puerta al frente, en su interior contaba con instalaciones de agua, drenaje, energía eléctrica y lámparas de luz de día: se adquirieron jaulas, termómetros (teletermómetro), mesa de trabajo, mesa de equipo y materiales, higrometro, material de vidrio, etc. requeridos para la realización de la prueba.

Una vez acondicionado el Bioterio y controladas las condiciones de humedad y temperatura se adquirieron 12 conejos Nueva Zelanda, machos de 1,2 Kg. de peso medio, de aprox. 2 semanas de destete (6 semanas de edad) sanos y criados con exposición a el medio ambiente, se inició un programa de adaptación a las condiciones del nuevo Bioterio: se fijó una dieta de 100 g diarios de alimento Albamex y Purina. Los dos primeros

posteriores a la llegada de los animales solo se entró a el Bioterio alimentar a los conejos, verificando que los suministros de agua es en funcionando adecuadamente, que la limpieza fuese propiamente rea y para corroborar el estado de salud de los animales.

Se inició un programa de manejo de los animales para su comple adaptación al lugar y a la prueba específica; introduciendo el ali por la puerta principal de la jaula, para permitir que el animal ba el olor de la persona que lo va a manejar y adquiriera confianza y mbre a él. Los dias siguientes se repitió la operación acariciando también. Periódicamente se les revisó las orejas y se verificó que el miento fuera normal , no presentaran nerviosismo o algún otro síntoma adaptación. Posteriormente se inició la adaptación a la prueba de pi os, pesandolos, colocandolos en los cepos de contención por 20 minu marcando en las orejas el número designado a cada animal para buen ol, observando su comportamiento y teniendo toda su historia durante da en el bioterio (es necesario llevar una libreta con la información ta de cada animal) . Continuando el programa se procedió a iniciar ma de temperaturas rectales con termómetro clínico, dejando a los co en los cepos progresivamente por 45 minutos, una hora, dos, hasta 5 ; se iniciaron simulacros de prueba, dejando a los conejos en los ce por todo el tiempo que habitualmente dura la prueba y tomando un total nco temperaturas rectales durante este período Finalmente al conside e que la adaptación estaba completamente realizada, a continuación se do el manejo a los animales y comportamiento de éstos a la inserción termómetro; corriendo varios simulacros de prueba sin inyectar a los ani

les, obteniéndose magníficos resultados; con ésta base se procedió a va
dar el método utilizando agua para inyectables (a la cual ya se había de
terminado su ausencia de pirógenos en otro laboratorio por el método de la
S.P. realizando la prueba con los doce conejos de la colonia, obteniendo
con esto resultados altamente satisfactorios con lo cual quedó instalado
completamente el Bioterio y la prueba de pirógenos oficial en el laborato
rio.

Es requisito el evaluar los termómetros para la prueba de piróge
nos por conejo (39), para cumplir este punto se procedió a la investigación
de la calibración de los termómetros clínicos en su fabricación, asimismo
el sistema de calibración integrada del teletermómetro.

Los termómetros clínicos utilizados (B-D) son calibrados a 3 tem
peraturas: 37°, 39° y 41°C, por inmersión en baños con agua a dichas tempera
turas, observando la temperatura del baño con un termómetro maestro (termó-
metro certificado en E.U.A. el cual se revisa cada 3 a 6 meses (D.G.N), los
termómetros que varien en más de 0.1°C con respecto al control en el rango
de 37 a 39°C son descartados, y el que varíe más de 0.2°C a una temperatu
ra de 41°C es descartado. Cada termómetro se coloca en el baño por 3 mi-
nutos, alcanzando la máxima temperatura en el primer minuto; finalmente
se prueba que la columna de mercurio baje adecuadamente, lo cual se reali-
za colocando los termómetros en una centrifuga a 300 r.p.m. por 30 seg., -
la columna que no baje en éstas condiciones se considera inadecuada, des-
cartando el termómetro.

El teletermómetro utilizado (Ellab instruments tipo TE-3) se

En posición de calentamiento a 33°C , se le realizó una prueba para valencia o linealidad entre sus cinco terminales, sumergiendo los res en nujol con agitación y con administración de calor suavemente incrementar la temperatura 0.1°C aproximadamente cada minuto, se obtuvo una buena reproducibilidad de la lectura entre las cinco terminales, las terminales en el rango de 26.6°C a 44.0°C dieron exactamente las lecturas, la otra terminal en la parte final del rango (37.3 a 44.0°C) diferenció de 0.1°C abajo del resto.

Finalmente se comparó el teletermómetro con los termómetros clínicos observando paralelismo, pero con una diferencia de 0.2° , 0.25° y 0.45°C , cual se descartó al último termómetro.

Con base a lo probado anteriormente se optó por trabajar con el teletermómetro y en caso de así requerirse con el termómetro clínico que menor diferencia mostró con respecto al teletermómetro utilizando siempre el termómetro para un conejo determinado o la misma terminal del teletermómetro, evitando de este modo introducir variaciones en las lecturas de temperaturas debidas al equipo de medición.

Elaboración de un área controlada para la prueba de Limulus (LAL).

La prueba de L.A.L. por su gran sensibilidad requiere de trabajo en un lugar controlado, preferentemente bajo la zona de protección de flujo laminar para evitar primordialmente obtener falsos positivos, por tanto se estudió en qué parte del laboratorio era aconsejable instalar un área con estas características, ya que el Depto. de microbiología contaba con estas instalaciones tenía bastantes usos, interfiriendo

en las operaciones rutinarias; Se determinó que un pequeño local que
 anteriormente se utilizaba para llenado de cápsulas era adecuado por lo
 tanto se procedió a vaciarse completamente, se sanitizó con solución de Fe
 ples, posteriormente se aplicó una capa de sol. de amonio cuaterna-
 do con el fin de proteger por un período más prolongado la zona. Se in-
 trodujo en esta una campana de flujo laminar, un mueble con tres platafor-
 mas y una mesa con silla, todo se limpió con las soluciones sanitizantes.
 Una vez instalada el área, conectada la campana, etc., se validó el funcio-
 namiento de la campana, mediante exposición de cajas petri con medio Sabou-
 aud y CasoY por período de treinta minutos, colocados en las cuatro es-
 quinas internas de la zona del flujo laminar, en el centro dos cajas más
 expuestas a el medio ambiente sobre la mesa y finalmente dos cajas sin ex-
 poner utilizadas como controles negativos. Se incubaron por 14 días, rea-
 lizando observaciones frecuentes, llevando un control estricto de la in-
 formación obtenida; después de 14 días se observó desarrollo de 4 colo-
 nias (3 en una caja y 1 en otra), perteneciendo al centro y entrada al
 flujo laminar, no hubo desarrollo de hongos. En los controles positivos
 crecieron colonias: 5 de hongos y 4 de bacterias, sin existir de-
 sarrollo en los controles negativos. (Información total de 10 cajas traba-
 jadas).

Se procedió nuevamente a validar el área y campana a los siete
 días de iniciarse la primer validación para determinar la contaminación
 recibida y corroborar los datos; en esta ocasión se utilizaron 12 cajas;
 4 en las esquinas, 2 en el centro, 2 en la sección de acceso al flujo
 laminar; 2 más como control positivo (medio ambiente) y dos como control

negativo. Los resultados fueron no hubo desarrollo de hongos dentro del flujo laminar, solo 3 en las cajas de acceso al mismo, en los controles positivos (3); una bacteria en la esquina interna del flujo laminar, 8 bacterias en la entrada al flujo y 33 en el control positivo con lo cual se determinó un buen funcionamiento de la campana de flujo laminar, pero aún así se solicitó un servicio a la misma, determinándose que funcionaba adecuadamente, siendo conveniente su operación por un buen tiempo ya que no había sido utilizada en aproximadamente 8 meses y requería limpiarse una red metálica que soporta los filtros de aire; de ésta manera quedó instalada en el área, y todo equipo o material, que entrase se limpiaba con solución a el 70 % de isopropanol. Inicialmente ésta área se utilizó para preparar las soluciones a inyectar a los conejos, ya que se requiere realizar diluciones a los medicamentos en una zona estéril, la cual nos ofrece la campana de flujo laminar.

El baño maría utilizado se evaluó y calibró para que mantuviese la temperatura por $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, el baño no tenía agitación que rompiese la formación del gel. La determinación de la temperatura adecuada del baño se realizó introduciendo un termómetro en un tubo de ensaye de 10 x 75 mm. con agua en cantidad suficiente para cubrir unicamente el bulbo. Este tubo se colocó en la gradilla, en la cual se colocarían los tubos de prueba de L.A.L. y se sumergió en el baño, la temperatura debía ser $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, que es la temperatura requerida en la solución del tubo de prueba, esta temperatura requería ser mantenida por varias horas, se debía verificar periódicamente el nivel de agua (determinado previamente para que cubriese y pasara el nivel de la solución a incubar en dos centímetros)

evitar variaciones en la temperatura. Durante la operación del o se mantuvo este termómetro sumergido a un tubo con las características señaladas para verificar el funcionamiento adecuado del baño; el o al cual se alcanzaba la temperatura deseada equilibrio en el interior del tubo fué de 3 minutos a partir de su inmersión.

ño de las pruebas necesarias para realizar la validación.

Como se señaló en las generalidades existen diferentes protocolos de prueba tanto para la prueba en conejos como para el L.A.L. según el o. A continuación se señalan las técnicas seguidas y en que están fundamentadas:

Para la prueba en conejo se estableció el protocolo de prueba ba en cumplir lo señalado en la F.N.E.U.M., añadiendo límites o señalamientos de otras farmacopeas mostrados en páginas anteriores, finalmente se o a los siguientes lineamientos:

males de prueba: utilizar conejos sanos, adultos, de un peso no menor 8 Kq., preferentemente machos, raza Nueva Zelanda, alimentar con una a uniforme completa. (aprox. 100 g diarios).

instalaciones: Las instalaciones en las cuales se realiza la prueba, de tener una temperatura uniforme, con una variación no mayor a $\pm 3^{\circ}\text{C}$ du e el tiempo que dure la misma, así como las 4 horas previas a esta. instalaciones deben ser aisladas, tranquilas y sin perturbaciones.

erial: el material de vidrio, agujas y jeringas, debe ser lavado con án y enjuagado con agua destilada; para desnitrogenar el material de-

locarse en el horno a 200°C durante 2 horas como mínimo.

ómetros: Las determinaciones de temperatura deben realizarse con termómetro clínico o electrónico, al cual se le comprobó su exactitud no varía más de $\pm 0.1^\circ\text{C}$, se debe determinar el tiempo al cual se alcanza máxima lectura (equilibrio), prolongando este período durante la prueba.

Programa de Adaptación de los Animales:

Antes de utilizar a un conejo por primera vez para una prueba, lleva un programa de adaptación al medio ambiente, así como al manejo de los mismos. Posteriormente se hace un simulacro con todos los pasos de la prueba sin inyección; pasada la prueba anterior, se hace un segundo simulacro inyectando 10 ml/Kg. de peso de solución de cloruro de sodio isotónico (0.85%) y libre de pirógenos, no empleando a aquellos conejos cuya temperatura varíe alrededor de 0.6°C o más, hasta que la variación sea mínima.

Procedimiento: Trabajar en un área separada de la granja y separar los animales de prueba un día antes (aproximadamente a las 5 p.m.), realizando una determinación de temperatura, no empleando aquellos animales si su temperatura varíe más de 1°C entre una determinación y otra.

El termómetro o dispositivo electrónico debe ser insertado en el recto a una profundidad de 8.5 cm., una vez determinada la temperatura colocar los animales en jaulas en el área de trabajo, retirar el alimento durante la noche. Al término del tiempo de duración de la prueba, retirando el agua durante la prueba.

El día de la prueba pesar los animales y colocarlos en los cepos. Antes de la prueba, 90 minutos antes de iniciar la prueba determinar la temperatura.

tura rectal a los 40 y 10 minutos previos a la prueba no empleando aquellos con temperatura mayor a 39.8°C o menor a 38.5°C , el promedio de las dos lecturas de temperatura es la temperatura inicial, base de comparación. Administrar intravenosamente a 3 conejos el producto a probar en la vena marginal de una de las orejas, el líquido a aplicar debe estar a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Determinar la temperatura rectal 1, 2 y 3 horas después de la inyección, y determinar los incrementos en temperatura con respecto a la inicial, el incremento en temperatura negativo se considera como cero.

Dosis: Para Agua para inyectables aplicar 10 ml/Kg. de peso, añadiendo previamente la cantidad de NaCl necesaria para tener una solución isotónica (0.85%), inyectar en un periodo ligeramente superior a 2 minutos.

Nalbu fina clorhidrato.- El medicamento requiere de un tratamiento previo, el cual consiste en: Tomar 5 ml de él, transferirlos a un matraz volumétrico de 100ml, añadir 75 ml de solución de NaCl al 0.85% en agua para inyectables, ajustar pH a 7 (aprox. 1 ml de NaOH 1N), aforar con solución de NaCl al 0.85% en agua para inyectables. Aplicar 5 ml de esta solución por Kg de peso en un tiempo ligeramente superior a 1 minuto (todo el material y sustancias utilizadas deben estar libres de pirógenos).

Naloxona Clorhidrato: Aplicar una dosis de 2 ml/Kg. de peso, tomando la muestra directamente de las ampollitas en condiciones asépticas inyectando en un periodo ligeramente superior a un minuto.

Acetato de hidroxocobalamina ó Clorhidrato de tiamina.- Tomar 8 ml del producto, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar-

con A.P.I. isotónica, inyectar 1 ml/kg de peso en un período ligeramente superior a un minuto.

Complejo B.- Tomar 16 ml del medicamento, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con A.P.I. isotónica inyectar 1 ml/Kg de peso en un período ligeramente superior a un minuto.

Interpretación de resultados:

a) La suma de incrementos de temperatura no debe ser mayor a 1.4°C y el individual debe ser menor de 0.6°C . En caso de no cumplirse con alguno de estos límites se repite la prueba con 5 conejos y se suman los resultados interpretándose de la siguiente manera:

b) El incremento individual en no más de tres conejos, puede ser de 0.6°C o mayor, y el incremento total (8 conejos) no debe ser mayor a 3.7°C , con lo cual pasa la prueba de pirógenos.

Los conejos se pueden someter a la prueba una vez cada 48 horas, si es satisfactoria; y no antes de dos semanas, cuando se les haya inyectado un medicamento pirogénico.

La información acerca de las dosis aplicadas de Nalbufina y Naloxona están basadas en los manuales de control de calidad del laboratorio, el agua para inyectables se menciona en la F.N.E.U.M., a los demás medicamentos no se les realizaba anteriormente la prueba debido a la información de poca confiabilidad en la aplicación de la prueba por la tiamina presente; para evitar problemas de toxicidad, basados en experiencias de la S.S.A. y otros laboratorios, se decidió inyectar cinco veces la dosis humana por

g de peso al conejo; si observamos que estos medicamentos se inyectan a razón de 1 ó 2 ml a un humano de 65 a 70 Kg estamos aplicando 1.54×10^{-2} ó 3.08×10^{-2} ml por kg de peso, multiplicado por 5 obtenemos 7.7×10^{-2} y 15.4×10^{-2} ml por kg de peso de conejo; por lo tanto como se vió en la preparación de la solución a inyectar en conejo, se toman 8 ó 16 ml del medicamento y se diluyen a 100 ml, quedando la dosis por kg en un mililitro de solución.

Como una medida de apoyo a los resultados, en algunos casos los medicamentos fueron analizados en un segundo laboratorio, corroborando con esto que la prueba se estaba realizando correctamente.

Determinación de la sensibilidad de la colonia de conejos: Una vez que se completaron todas las pruebas en los conejos, se procedió a determinar su sensibilidad a endotoxina de E. coli 055:B5 inyectando dosis progresivas del pirogeno en solución acuosa, la dosis fluctuó entre 0.05 a 5 g/kg determinado con esto la capacidad pirogénica del control positivo utilizado por el proveedor del reactivo de L.A.L., correlacionando con lo escrito en la literatura referente a la endotoxina de referencia EC-2; la endotoxina se diluyó con agua, ajustando la concentración para aplicar 0.5 ml por kg. de peso.

prueba de L.A.L.

Las siguientes pruebas tienen como objetivo demostrar la compatibilidad, sensibilidad, y reproducibilidad del L.A.L.

Es necesario evitar las fuentes de inhibición ya conocidas, por lo cual se requiere observar el pH del producto a estudiar, ajustandolo en

de peso al conejo; si observamos que estos medicamentos se inyectan a razón de 1 ó 2 ml a un humano de 65 a 70 Kg estamos aplicando 1.54×10^{-2} ó 3.08×10^{-2} ml por kg de peso, multiplicado por 5 obtenemos 7.7×10^{-2} y 15.4×10^{-2} ml por kg de peso de conejo; por lo tanto como se vió en la preparación de la solución a inyectar en conejo, se toman 8 ó 16 ml del medicamento y se diluyen a 100 ml, quedando la dosis por kg en un mililitro de solución.

Como una medida de apoyo a los resultados, en algunos casos los medicamentos fueron analizados en un segundo laboratorio, corroborando con esto que la prueba se estaba realizando correctamente.

Determinación de la sensibilidad de la colonia de conejos: Una vez que se completaron todas las pruebas en los conejos, se procedió a determinar su sensibilidad a endotoxina de E. coli 055:B5 inyectando dosis progresivas del pirógeno en solución acuosa, la dosis fluctuó entre 0.05 a 5 g/kg determinado con esto la capacidad pirogénica del control positivo utilizado por el proveedor del reactivo de L.A.L., correlacionando con lo escrito en la literatura referente a la endotoxina de referencia EC-2; la endotoxina se diluyó con agua, ajustando la concentración para aplicar 0.5 ml por kg. de peso.

Prueba de L.A.L.

Las siguientes pruebas tienen como objetivo demostrar la compatibilidad, sensibilidad, y reproducibilidad del L.A.L.

Es necesario evitar las fuentes de inhibición ya conocidas, por lo cual se requiere observar el pH del producto a estudiar, ajustándolo en

de ser necesario, además revisar si la formulación lleva agentes que -
 es, en caso positivo añadir Ca^{++}

Corregido el pH, como una prueba primaria es necesario determi -
 si el producto está contaminado y en caso positivo determinar a que
 de dilución es detectable, decidiendo si afecta el trabajo de valida_
 , debido a lo cual puede no ser confiable su uso en la validación del
 ucto.

El siguiente paso es determinar el punto final del reactivo de
 L. en agua; del mismo modo realizar una prueba con concentraciones si -
 res de endotoxina en el medicamento diluido a la MDV -máxima dilución
 da-(Utilizar la menor MDV de acuerdo a los límites de sensibilidad del
 tivo), el punto final en el medicamento no debe variar más de una dilu_
 n 1:2 con respecto al agua.

La reproducibilidad del método se demuestra repitiendo la prueba
 compatibilidad en varios lotes diferentes. Según la F.D.A. es adecuada
 para en 3 lotes, para la S.S.A. debe probarse en 5 lotes en ca -
 de utensilios médicos (jeringas, equipo de venoclisis, etc).

Los cálculos de las MDV (Máxima Dilución Válida) se muestran a
 inuación, observar las diferencias con respecto al factor de dilución
 te, que se utilizaba cuando se inició la validación.

Límite FDA peso medio de un humano

$5 \text{ UE/Kg} \times 70 \text{ Kg.} = 350 \text{ UE / Dosis humana}$

Si $1 \text{ UE} = 0.2 \text{ ng endotoxina EC-2}$

$350 \text{ UE/Dosis} \times 0.2 \text{ ng/U.E} = 70 \text{ ng/Dosis.}$

Factor de dilución

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{Max. conc. de endotoxina permisible } 70 \text{ ng/dosis}}{\text{Sensib. L.A.L.}} \times \frac{1}{\lambda} \times \frac{1}{\text{Vol. dosis}}$$

$$\text{MDV} = \frac{C (\text{Conc. farmaco}) K (\text{límite de tolerancia } 5 \text{ UE})}{\lambda (\text{sensib. del reactivo}) M (\text{Máxima dosis}/K)}$$

Cálculo del factor de dilución límite

Volumen por dosis

- A) Naibufina 1 ml
- B) Naloxona 3 ml
- C) Hidroxocobalamina 1 ml
- D) Tiamina y Piridoxina 1 ml
- E) Complejo B 2 ml
- F) Aqua para inyectables -

Si $\lambda = 0.05 \text{ ng endotoxina}$

- A) $70 \times 1/0.05 = 1400$
 - B) $70/3 \times 1/0.05 = 467$
 - C) $35* \times 1/0.05 = 700$
 - D) $35* \times 1/0.05 = 700$
 - E) $70/2 \times 1/0.05 = 700$
 - F) Directo = $\frac{0.05}{0.05}$
- Estos factores señalan el número de veces que se debe diluir la muestra para hacerla reaccionar con el L.A.L.
- Si el límite = 50 pg/ml

*D) y E) Esto es porque la presentación son 2 ampollitas que se mezclan en el momento de su aplicación.

Factor de dilución =

$$\frac{\text{Max. conc. de endotoxina permisible } 70 \text{ ng/Dosis}}{\text{Sensib. L.A.L.}} \times \frac{1}{\lambda}$$

$$\text{MDV} = \frac{C (\text{Conc. farmaco}) K (\text{límite de tolerancia } 5 \text{ UE})}{\lambda (\text{sensib. del reactivo}) M (\text{Máxima dosis}/K\alpha)}$$

Cálculo del factor de dilución límite

Volumen por dosis

- A) Naibufina 1 ml
- B) Naloxona 3 ml
- C) Hidroxocobalamina 1 ml
- D) Tiamina y Piridoxina 1 ml
- E) Complejo B 2 ml
- F) Aqua para inyectables —

Si $\lambda = 0.05 \text{ ng endotoxina}$

A) $70 \times 1/0.05 = 1400$

B) $70/3 \times 1/0.05 = 467$

C) $35* \times 1/0.05 = 700$

D) $35* \times 1/0.05 = 700$

E) $70/2 \times 1/0.05 = 700$

F) Directo = $\frac{0.05}{0.05}$

Estos factores señalan el número de veces que se debe diluir la muestra para hacerla reaccionar con el L.A.L.

Si el límite = 50 pg/ml

* C) y E) Esto es porque la presentación son 2 ampollitas que se mezclan en el momento de su aplicación.

Cálculo de la MDV

ación de H (Máxima dosis/Kg).

ulina: Dosis humana 1 ml a 70 Kg = 0.0143 ml/Kg

Dosis conejo 5 ml \rightarrow 100 ml $H_2O \rightarrow$ 5 ml/Kg = 0.25 ml/Kg

ona: Dosis humana 3 ml a 70 Kg = 0.0429 ml/Kg

Dosis conejo 2 ml a 1 Kg = 2 ml/Kg

oxocobalamina: Dosis humano 1 ml a 70 Kg = 0.0143 ml/Kg

Dosis conejo 8 ml \rightarrow 100 ml $H_2O \rightarrow$ 1 ml/Kg = 0.08 ml/Kg

ina y Piridoxina: Igual al punto C).

lejo B: Dosis humano 2 ml a 70 Kg = 0.0286 ml/Kg

Dosis conejo 16 ml \rightarrow 100 ml $H_2O \rightarrow$ 1 ml/Kg = 0.160 ml/Kg

tanto aplicando la información anterior obtenemos:

Si $\lambda = 0.05$ ng/ml

Si $\lambda = 25$ pg/ml Si $\lambda = 12.5$ pg/ml

$$= \frac{1 \text{ ng/Kg}}{0.05 \text{ ng/ml} \times 0.25 \text{ ml/Kg}}$$

= 80

160

320

$$= \frac{1}{0.05 \times 2}$$

= 10

20

40

$$MDV = \frac{0.5 *}{0.05 \times 0.08}$$

= 125

250

500

$$= \frac{1}{0.05 \times 0.16}$$

= 125

250

500

0.05/0.05

= Directo

2

4

ve de endotoxina es la mitad que en otros productos ya que al unirse do de las ampollitas en suma podrían dar como máximo la concentración /dosis.

ultras condensadas:

$$10V = 4.0 / \lambda$$

$$10V = 0.5 / \lambda$$

$$10V = 6.25 / \lambda$$

$$10V = 6.25 / \lambda$$

$$10V = 6.25 / \lambda$$

$$10V = 0.05 / \lambda$$

Para el agua para inyectables, se utilizó un límite de 50 ml, esto se basa en el hecho de que la sensibilidad del conejo a la toxina EC-2 es igual a 1ng/kg, por lo tanto si aplicamos 10 ml/kg. de agua para inyectables el conejo detecta 100 pg/ml. Con la variabilidad del L.L., si fijamos como límite 50pg/ml nos da un mayor margen de seguridad respecto al conejo.

Con las bases señaladas anteriormente se procedió a desarrollar - siguientes protocolos de prueba que fueron los que se aplicaron para va ar la nueva prueba.

estramiento del Químico.

Es necesario que el químico que va a realizar la prueba la domine, que ésta es delicada y sensible, por lo cual si no se tiene la habilidadiciente y las condiciones adecuadas, el resultado se verá afectado; por tanto es necesario que se realice una práctica con el reactivo proban muestras positivas y negativas.

-Validación del Químico

Cuando el Químico ya realice la prueba adecuadamente se requiere aplicar una prueba inicial de control, al químico y laboratorio. Según señala la FDA, es requisito evaluar la variabilidad del químico y del laboratorio en la realización de esta prueba. Se debe preparar una serie de diluciones de la endotoxina en relación 1:2 en las concentraciones próximas al punto final de ese lote de reactivo, realizar la prueba con 4 réplicas como mínimo o máximo 8, finalmente verificar que la variación este dentro de los límites determinados en esta publicación (31) (FDA), si se cumplen se procede a la aplicación de la técnica analítica diseñada; al mismo tiempo con esta información se obtiene la sensibilidad del lote de reactivo con respecto a determinado lote de endotoxina.

-Técnicas analíticas realizadas

·Ajuste de pH:

Tomar 10 ml del medicamento y verterlo en un vaso de op. de 50 ml determinar el pH (inicial), añadir solución de NaOH 1.0 N hasta pH de 6.5 a 7.0, determinar el volumen de solución de NaOH 1 N añadido.

·Determinación de no contaminación del producto con endotoxina.

a) Dilución de las muestras: (realizarse en campana de flujo lami

Nalbu fina- Tomar 20 ml del producto, añadir la cantidad de NaOH 1 N necesaria para ajustar pH (4ml) (Muestra Directa).

De la solución anterior tomar una muestra de 1.2 ml y llevarla a 40 ml con A.P.I. (libre de endotoxina) (Dilución 1:40 = MDV/ 2.)

Tomar 25 ml. de la solución anterior y llevar a 50 ml con A.P.I. (Dilución 1:80 = MDV).

Naloxona... Tomar 20 ml del producto, añadir la cantidad de NaOH necesaria para ajustar pH (0,2 ml) (Muestra Directa).

De la solución anterior tomar 6 ml y llevarla a 30 ml con A.P.I. (Dilución 1:5 = MDV/2) Recolectar una muestra de 25 ml de la solución anterior y llevarla a 50 ml (Dilución 1:10 = MDV)

Complejo B... Tomar 20 ml de producto (mínimo de 10 viales diferentes) añadir la cantidad de NaOH 1N necesario para ajustar el pH (5.2 ml) (Muestra directa).

De la solución anterior tomar una muestra de 2.5 ml y llevarla a 125 ml con A.P.I. (Dil. 1:62.5 = MDV/ 2.)

Recolectar una muestra de 25 ml de la sol. anterior y llevarla a 125 ml (Dilución 1:125 = MDV)

Hidroxocobalamina; Tiamina y Piridoxina... Tomar 20 ml del producto, añadir la cantidad de NaOH 1 N necesaria para ajustar el pH [5.6 (Hidroxocobalamina) y 11.2 ml tiamina (Muestra Directa)]

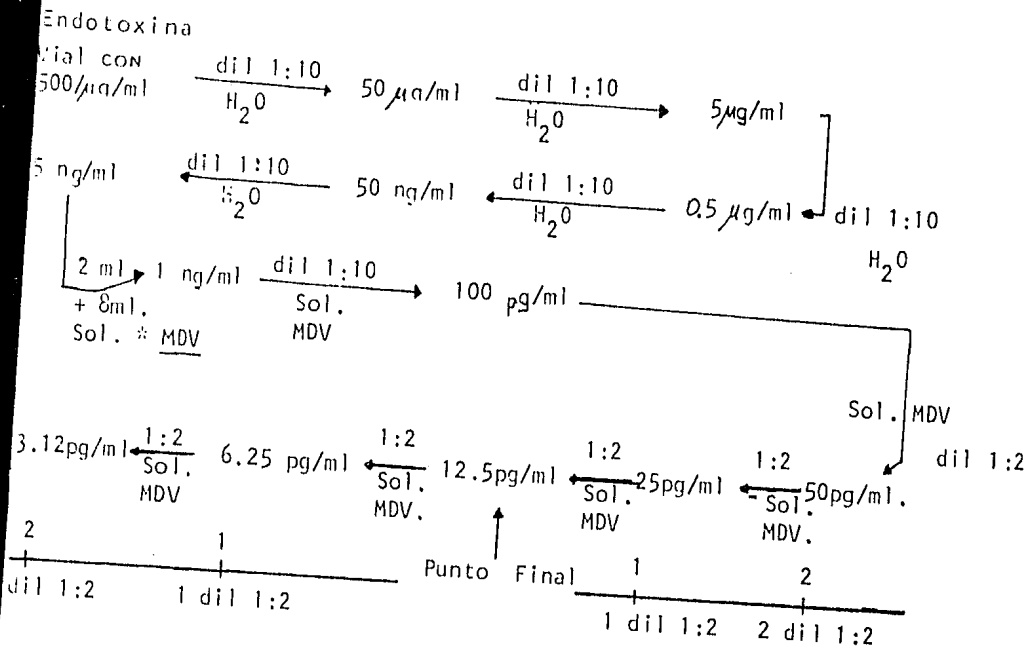
De la solución anterior tomar una muestra de 2.6 ml ó 3.1 ml según sea el caso y llevarlo a 125 ml con A.P.I (Dilución 1:62.5 = MDV/ 2). Recolectar una muestra de 25 ml de la sol. anterior y llevarla a 50 ml (Dilución 1:125 = MDV)

b) Una vez diluido el producto, ensayar por duplicado la muestra directa, a la MDV/2 y diluida a la MDV -aplicando el método del gel firme en este caso; el producto no debe dar resultado positivo en ninguno de los casos, ya que esto señalaría que tiene niveles de endotoxina abajo de los pirogénicos, o pirogénicos en el caso de que se obtuviese respuesta positiva a la MDV, alterando los resultados del siguiente paso, por lo tanto, si se obtiene un resultado positivo en alguna de las diluciones el producto no está apto para el trabajo de validación.

Determinación de compatibilidad

Reconstituir la endotoxina y seguir el siguiente diagrama de dilución:

dilución:



Observar que a partir de la solución de 5 ng/ml las diluciones lizan con la solución del medicamento a la MDV, finalmente se hacen las diluciones más próximas al punto final, \pm dos diluciones observando de esta manera si el producto es compatible o existe ya inhibición o activación de la reacción. Las bases para determinar si el producto es compatible o no se señalaron en las generalidades; como se indicó en la página No. 103 es recomendable utilizar el producto a la mínima MDV según los límites de sensibilidad del reactivo; esto es si nuestro reactivo tiene como límites de sensibilidad, para ser usado por el laboratorio, un valor entre 50 a 6.25 $\mu\text{g/ml}$, y si el producto a probar fuese nalbufina, existen varios factores de MDV por ejemplo: si $\lambda = 50 \mu\text{g/ml}$ entonces MDV = 80, si $\lambda = 25 \mu\text{g/ml}$ entonces MDV = 160; si $\lambda = 12.5$ entonces MDV = 320, por lo tanto si validamos el producto diluido 320 veces y obtenemos que es compatible, al utilizarlo con un reactivo de $\lambda = 50 \mu\text{g/ml}$ podría inhibir la reacción dando falsos negativos, no es válida su aplicación de la prueba a esta dilución; si por el contrario es válida el producto a una dilución 1:80 y posteriormente se prueba diluido 320 tenemos la seguridad de que a más diluido el producto menor probabilidad de inhibición existe, siendo válida su aplicación para la prueba a esta dilución; se debe tomar en cuenta que por lo tanto es posible obtener una respuesta positiva en L.A.L. y resultar negativo en el conejo (comparación entre ambas pruebas) debido a la mayor sensibilidad del reactivo a esta dilución.

Para demostrar la reproducibilidad del método se probaron 5 lotes de cada producto.

Para reportar los resultados obtenidos para la validación de la prueba L.A.L. y para la prueba de pirógenos oficial se utilizaron los siguientes formatos, los cuales se recomiendan utilizar en caso de realizar la validación del L.A.L. ya que presentan facilidad para el análisis de la información ahí asentada, estos formatos se ilustran a continuación:



Du Pont Farmacéuticos de México, S.A.

CONTROL DE CALIDAD - PRUEBA DE PIRÓGENOS

NOMBRE DEL PRODUCTO		PRESENTACION	LOTE
NO. Y TIPO DE ENV.	CANTIDAD POR ENVASE		MUESTREO
DOSIS A APLICAR POR KG DE CONEJO			FECHA

ANALISIS NO:
LIBRO/PAGINA:

CONDICIONES DEL BIOTERIO DURANTE LA PRUEBA.
TEMPERATURA:
HUMEDAD:

CONEJO NUMERO	TERMO- METRO	TEMP. DIA ANT.	PESO (Kg)	TEMP. INICIAL				TEMP. BASAL	VOL. APLIC.	HORA	TEMP. 1 HORA		TEMP. 2 HORAS		TEMP. 3 HORAS		INCR. TEMP.	OBSERVA- CIONES.
				°C	HR	°C	HR				°C	HR	°C	HR				

:: INCREMENTO TOTAL: _____

+ INCREMENTO TOTAL: _____

Interpretación de resultados:
 * El incremento total no debe ser mayor a 1.4°C
 y el individual debe ser menor de 0.6°C.
 † El incremento individual no más de tres 50.

TIEMPOS	
QUIMICO	H/H

DICTAMEN	REALIZO

Producto		Lote		Lote	
Nombre		Fecha caduc.		Fecha de reconst.	
Lote		Sensibilidad		Caducidad	
MDV		Endotox. de R.		Cad. por reconst.	
		A.P.I. Lote			

1) Ajuste de pH: pH inicial _____, pH final _____ Vol NaOH IN añadido _____

2) Adición de Ca⁺⁺ _____ pH MDV _____

3) Serie de dilución Control:

Conc. Endotox: en pg/ml

Resultados

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

4) Control del producto:

Dilución

Resultados

Sin diluir		MDV/2		MDV	

5) Compatibilidad del producto

a) Diluir el medicamento (Ajustado el pH) con A.P.I a la MDV,

b) Agregar endotoxina en concentraciones similares a la serie de diluciones control,

Dilución

Resultados

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

6) Interpretación de Resultados:

a) Serie Control 3)

b) Control del Producto 4)

c) Conc. de Endotox. detectada 5)

Resultado

Limites

50 pg/ml - 6.25 pg/ml.

Debe ser negativo.

2 x, x ó $\frac{x}{2}$ el valor reportado en a.

dos: Siguiendo las técnicas señaladas con anterioridad, se obtuvieron resultados que se señalan a continuación: para la prueba de L.A.L. se utilizó el reactivo comercial Pyrogent en tres diferentes sensibilidades: 50, 6.25 pg/ml. (tres lotes) asimismo se utilizaron 3 diferentes lotes de endotoxina.

Para facilidad de observación y comparación se reportan los resultados en forma de tabla, señalando los resultados de ambas pruebas para cada lote de medicamento. En el caso de la Naloxona no se contó con más lotes por lo cual no fué posible completar el estudio con los 5 que quedaban.

Para determinar la sensibilidad de la colonia de conejos a la toxina provista en el reactivo L.A.L. y utilizar este dato como un punto de referencia, se procedió a trabajar de la siguiente manera:

Se determinó el peso de los conejos y se distribuyeron en dos lotes por el método de la culebra Japonesa, pretendiendo con esto que dichos lotes fuesen equivalentes entre sí, quedando la distribución como se muestra en la tabla No. 36

Conejo #	Peso Kg
1	2.44
2	2.69
3	2.46
4	2.56
5	2.56
6	2.31
7	2.55
8	2.25
9	2.62
10	2.59
11	2.54
12	

conejo No. 4

		<u>Lotes</u>	
		<u>A</u>	<u>B</u>
2	2.69	10	2.62
5	2.56	11	2.59
6	2.56	8	2.55
3	2.46	12	2.54
1	2.44	7	2.31
9		9	2.25
12.71		14.86	
\bar{X} 2.542		\bar{X} 2.477	

Tabla No. 36

Lote →	A			B			C			D			E		
Medicamento ↓	≠	λ	p.f.	≠	λ	p.f.	≠	λ	p.f.	≠	λ	p.f.	≠	λ	p.f.
Naloxona	60	6.25	12.5	60	6.25	12.5	60	6.25	25?						
							60	6.25	12.5						
Nalbufina	210	50	75	210	50	25	40	12.5	18.75	40	12.5	25	40	12.5	12.5
	EC-4			EC-4											
Hidroxicoba lamina	40	12.5	25	40	12.5	6.25	40	12.5	18.75	40	12.5	18.75	40	12.5	4.68
Tiamina y Piridox.	40	12.5	18.75	60	6.25	6.25	60	6.25	6.25	60	6.25	9.37	60	6.25	12.5
Complejo B	60	6.25	12.5	60	6.25	9.37	60	6.25	12.5	60	6.25	6.25	60	6.25	6.25
A.P.I.			posi- tivo a			posi- tivo a			posi- tivo a			posi- tivo a			posi- tivo a
	60	6.25	10	60	6.25	10	60	6.25	10	60	6.25	10	60	6.25	10

≠ = Sensibilidad en pg/ml a endotoxina EC-2 (ó EC-4)

λ = Sensibilidad en pg/ml a endotoxina del producto comercial.

p.f. = Punto final en pg/ml a endotoxina del producto comercial.

Medicamento	A			B			C			D			E		
	Lote	Fecha de Real.	R ΔT	fecha de Real.	R ΔT	Fecha de Real.	R ΔT	Fecha de Real.	R ΔT	Fecha de Real.	R ΔT	Fecha de Real.	R ΔT		
Naloxona	+	26 Ag. 82	✓ 0.1	17 Sep. 82	✓ 0.3	22 Sen. 82	✓ 0.15								
	0	6 y 12 En. 82	✓ 0.8	18 Ag. 81	✓ 0.6	6 Ene. 83	✓ 1.2								
	Y	24 Feb 83	✓	28 Feb. 83	✓	28 Feb 83	✓								
Nalbufina	+	31 Ag. 82	✓ 0.05	3 Sept. 82	✓ 0.0	3 Sept. 82	✓ 0.0	14 Sep. 82	✓ 0.0	17 Sent 82	✓ 0.05				
	0	24 May 82	✓ 0.4	25 May 81	✓ 0.3	5 En. 81	✓ 0.3			13 Ag 81	✓ 0.00				
	Y	18 Enero 83	✓	20 Enero 83	✓	2 Feb. 83	✓	2 Feb 83	✓	4 Feb 83	✓				
Hidroxicoba lamina	+	7 Sep. 83	✓ 0.35	27 Sep 82	✓ 0.2	29 Sep. 82	✓ 0.2	4 Nov. 82	✓ 0.6	25 En 83	✓ 0.8				
	0	*		*		*		*		*	0.4				
	Y	28 mar 83	✓	30 mar. 83	✓	7 Abr 83	✓	30 mar 83	✓	7 Abril 83	✓				
Tiamina y Piridox,	+	24 Sep. 82	✓ 0.3	27 Sept. 82	✓ 0.25	13 Oct 82	✓ 0.8	19 Oct 82	✓ 0.55	7 Dic 82	✓ 0.15				
	0	*		*		*		*		*					
	Y	28 mar 83	✓	23 mar 83	✓	23 mar 83	✓	18 mar 83	✓	17 mar 83	✓				
Complejo B	+	7 Sep. 82	✓ 0.35	9 sep 82	✓ 0.05	9 sep 82	✓ 0.0	22 sept. 82	✓ 0.2	29 sep 82	✓ 0.25				
	0	*		*		*		*		*					
	Y	17 mar 83	✓	7 mar 83	✓	7 mar 83	✓	9 mar 83	✓	9 mar 83	✓				
A.P.L.	+	20 Ag. 82	✓ 0.15	14 Sep. 82	✓ 0.35	24 Sep 82	✓ 0.25	1° Oct 82	✓ 0.25	15 Oct 82	✓ 0.35				
	0														
	Y	16 Feb 83	✓	16 Feb 83	✓	16 Feb 83	✓	16 Feb 83	✓	16 feb 83	✓				

+ Prueba Oficial para liberación de lote, o para validación de la prueba LAL, realizado en Du Pont Farmacéuticos de México S.A.

0 Prueba Oficial para liberación de lote realizada en un segundo laboratorio.

Y Prueba de Limulus (L.A.L.) para validación del método.

* Anteriormente no se realizaba la prueba.

✓ Pasa la prueba,

× No pasa la prueba

R Resultado,

ΔT Suma total de los incrementos individuales de temperatura en la prueba en conejo.

NOTA: El signo ✓ en la prueba L.A.L. señala que el producto diluido a la mínima MDV, no dió resultado positivo.

Posteriormente se aplicaron dosis crecientes de endotoxina a los dos lotes en base a una distribución de números aleatorios, obteniéndose incrementos de temperatura en los animales los cuales se muestran en la tabla No. 37

Conejo	Dosis de endotoxina aplicada I.V. (ng/Kg.)						
	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0
1			0.0		0.3	0.5	
2			0.45		0.45	0.7	
3			0.05		0.55	1.05	
5			0.4		0.5	0.65	
6			0.5		0.3	0.85	
\bar{x}			0.28		0.42	0.75	
7	0.0 *	0.4		0.4			0.7
8	0.0	0.05		0.2			0.55
9	0.1	0.15		0.35			1.1
10	0.2	0.3		0.25			0.9
11	0.1	0.3		0.3			0.75
12	0.35	0.25		0.2			0.95
\bar{x}	0.125	0.242		0.283			0.825

* Todos los resultados reportados se encuentran indicados en°C.

Dosis	In Dosis	Respuesta (\bar{x})
0.05	-2.99	0.125
0.1	-2.3	0.242
0.25	-1.39	0.28
0.5	-0.69	0.283
1.0	0	0.42
2.5	0.92	0.75
5.0	1.61	0.825

Tabla No. 37

analizar los datos obtenidos por medio de una calculadora texas
nts 55 para la ecuación de una recta, se obtuvieron los siguientes

5098, intercepción = 0.52225, correlación = 0.94175

.6 entonces $x = 0.515$, $e^x = 1.6736$ ng/kg.

dosis-respuesta que se obtiene con los datos anteriores, es la que
ra en la figura No. 14.

ENDOTOXINA DE E. coli 055:B5

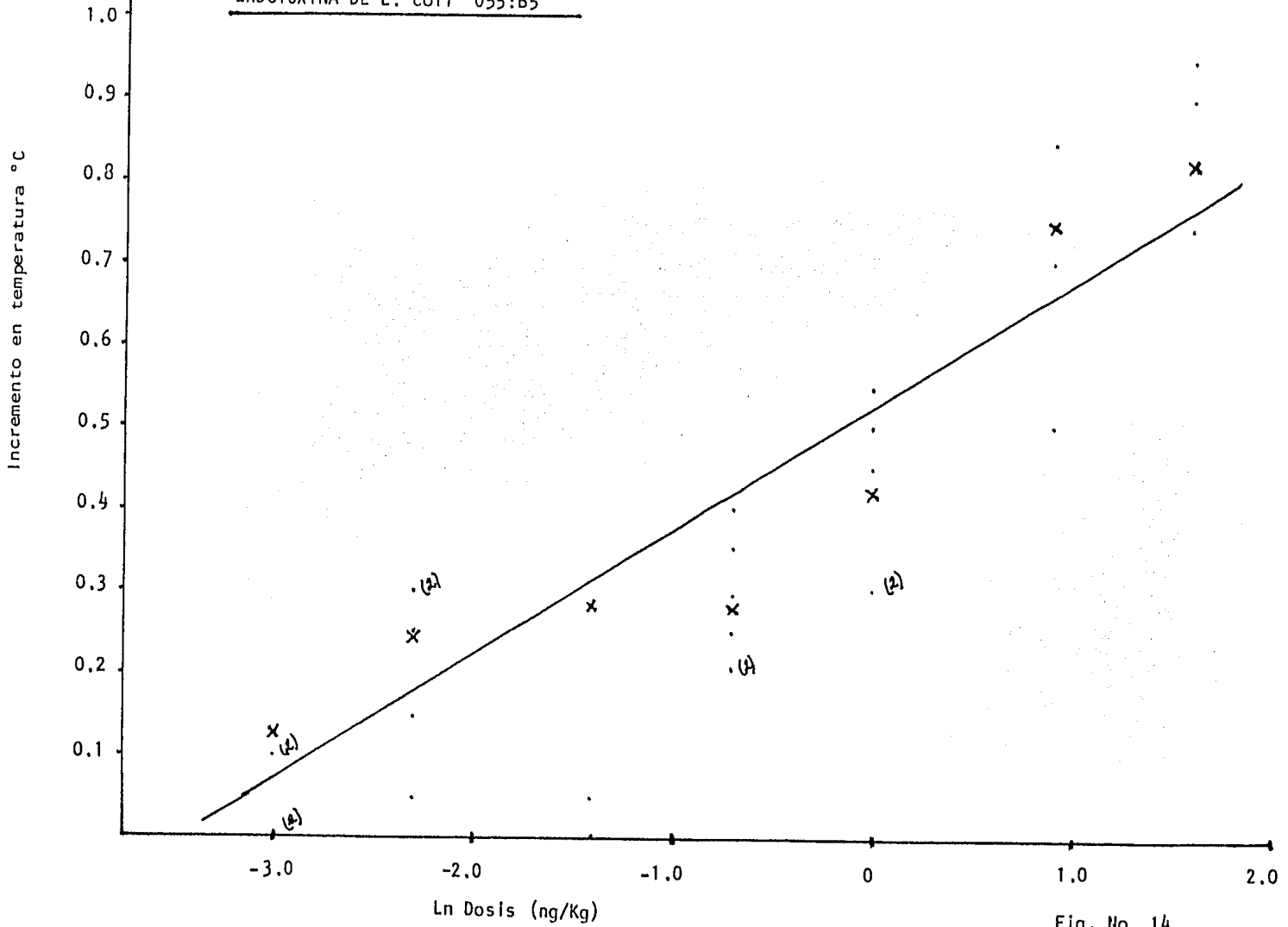


Fig. No. 14

CAPITULO IV
D I S C U S I O N

puesta a la endotoxina por los conejos:

Considerando una respuesta de 0.6° C como indicativa de nivel pirogénico de endotoxina, se obtiene de la gráfica que una cantidad de 1.67 ng de endotoxina de *E. coli* 055:B 5 (provista en el estuche) es pirogénica en esta colonia de conejos, obteniéndose con dicha endotoxina una menor potencia con respecto a lo reportado para la EC-2 (1.37 a 1.0 ng/kg), la cual solo podría confirmarse si se le inyectase la endotoxina EC-2 a esta colonia y comparando resultados; si bien también es posible realizar una comparación de actividades basándose en el comportamiento de ambas endotoxinas en la prueba L.A.L. como lo confirmaron algunos investigadores: a mayor actividad de una endotoxina en conejo, mayor sensibilidad a esta endotoxina se obtiene en L.A.L., si se observa la tabla de resultados de compatibilidades es notoria una mayor sensibilidad del L.A.L. a la endotoxina del estuche con respecto a la EC-2 (información del marbete del L.A.L.)

Esta menor potencia de la endotoxina del estuche da un mayor margen de seguridad en la aplicación de la prueba L.A.L., ya que se establece el método calculando la MDV con 1.0 Ng/kg o 5U.E. si se utiliza el valor experimental de 1.67, el factor de dilución sería mayor, por lo tanto, con los factores que se utilizaron se cumple los lineamientos establecidos por la F.D.A. y se garantiza un mayor margen de seguridad con una base experimental firme en los productos (Debemos hacer hincapié en que la endotoxina del estuche viene estandarizada, dando siempre la misma reactividad, según el proveedor.

o final y su variación en la prueba L.A.L.

En los puntos finales del reactivo L.A.L. con agua y el producto probar se observa que no hay variaciones mayores a una dilución 1:2 en los casos, excepto en dos (que se discutirán más adelante) esto es negativo de la compatibilidad de los productos con esta prueba, y nos da la reproducibilidad del ensayo en cada producto.

En el caso de la naloxona se repitió el ensayo, ya que en el primer experimento se obtuvo un punto final que señalaba inhibición del producto, al repetirse se observó que el punto final era el adecuado del límite inferior (siempre en los 3 lotes, se obtuvo el resultado del límite inferior). Con base a una información obtenida de Mallinckrodt Inc. el producto es compatible a la prueba en una dilución 1:16, y en el presente trabajo se probó en una dilución 1:10; Mallinckrodt Inc. probó el producto en diluciones 1:2, por lo tanto lo probó en 1:2 1:4, 1:8, etc; por lo cual el producto en algún punto entre 1:8 y 1:16 no inhibe, bien la inhibición no es detectable; al probarlo por el método cromatográfico se trabajó diluido 1:20 sin mostrar inhibición; por lo cual con esas bases es conveniente utilizar el producto para la prueba L.A.L. a una dilución de 1:20 o mayor, utilizando por lo tanto un reactivo con un mínimo de sensibilidad de 25 pg/ml (vs. endotoxina del estuche).

En el caso de la hidroxocobalamina lote E, se observó el punto final corrido hacia un valor de menor conc. de endotoxina, indicando una posible activación de la reacción; de la información de los 4 lotes anteriores se desprende algún indicio de activación, al probar el producto diluido

de menor MDV, se encontró que aunque no daba reacción positiva, formaba grumos indicando con esto que el medicamento contiene alguna cantidad de endotoxina que sí detecta el método; esta endotoxina más la que añadimos da una variación en el punto final, pero debido al motivo anterior; para corroborar si no existía problema en el producto, se probó nuevamente L.A.L. sin dar resultado positivo y por el método oficial (notar que es el producto que más alto incremento en temperatura mostro, lo que fué indicativo de alguna cantidad detectable de endotoxina). El método oficial es el que dió el resultado definitivo de no pirogenicidad del producto; por lo tanto se considera que el producto presenta reproducibilidad con la prueba L.A.L. siendo válida la aplicación del método.

Correlación L.A.L. - Conejo

Se observó una total equivalencia entre la prueba del conejo y L.A.L. todos los resultados negativos por conejo mostraron siempre un resultado negativo en L.A.L., es conveniente señalar el bajo incremento en temperatura en conejos, lo cual se debió a la pureza de los productos y al adiestramiento previo a la prueba, con lo cual se eliminaron variables que influenciarían los resultados finales. El medicamento que más alto incremento tuvo en conejos fue el que también nos ocasionó "problemas" con el L.A.L. y es la Hidroxocobalamina lote E, lo cual habla de la correlación conejo-L.A.L. (en un caso próximo a la pirogenicidad).

Como puntos derivados de este trabajo, en base a la experiencia adquirida surgen los siguientes comentarios:

Agua para inyectables en la prueba L.A.L.

Al realizarse la prueba de pirógenos al agua para inyectables (seria prima), se presentan discrepancias en los resultados al ser analizada por la prueba en conejo y el método de L.A.L.

De acuerdo al método de la U.S.P. y basado en la sensibilidad del conejo a la endotoxina (pirógeno) de referencia oficial, el conejo detecta 100 pg por mililitro (DP_{50}) en agua para inyectables.

El L.A.L. que utilizamos detecta de 50 a 6 pg/ml, primordialmente detecta 12.5 pg/ml que es como viene calibrado por lo tanto, se observa que es varias veces más sensible que el conejo.

Al probar un agua para inyectables, pasó la prueba de pirógenos en el conejo con un incremento total de $0.35^{\circ} C$, lo cual no da margen a duda de su apirogenicidad; al ser probada por L.A.L. con sensibilidad de 6 pg/ml la prueba dió positiva, observandose con esto que el L.A.L. es capaz de detectar lo que no puede el conejo; como conclusión, se obtuvo que el agua contenía menos de 100 pg/ml y más de 6 pg/ml. Un análisis posterior por L.A.L., usando diluciones, indicó que los niveles de endotoxina se encuentran entre 6 pg/ml y 12 pg/ml (mayor a 6 y menor a 12).

Observando los criterios de algunos laboratorios que aplican la prueba L.A.L. encontramos: los límites de endotoxina permitidos en un laboratorio de E.U. son 100 pg/ml para descartar el producto y 50 pg/ml como señal preventiva a probables problemas posteriores.

Dos laboratorios, uno de Puerto Rico y otro de México, rechazan

producto que de reacción positiva con el L.A.L., aún a niveles inferiores a 30 pg/ml, si el reactivo es capaz de detectarlo; esto nos da idea que el límite es no más de 30 pg/ml.

Se tiene noticia (no Oficial) que probablemente en la próxima U.S.P. se fijará el límite para el Agua por la prueba L.A.L. en 0.25 U.E./ml = 0.2 ng de endotoxina EC-2; por lo tanto, el límite sería 50 pg/ml.

El hombre detecta 1000 pg/kg. (DP 50) que es similar a lo que detecta el conejo al cual se le inyectaron 10 ml por Kg. en el caso del agua utilizada en el presente trabajo, ésta es utilizada para parenterales de pequeño volumen de aplicación, por dosis (máximo 2 ml por cada aplicación); sin embargo, existen otras posibles fuentes de contaminación provenientes de otras materias primas que componen el producto así como también a todo el proceso de manufactura que puede aumentar el contenido final de pirógeno.

Debido a lo arriba citado, es necesario conocer cual va a ser el criterio oficial para aprobar o rechazar el A.P.I. por el método LAL y con este criterio se va a fijar la concentración de endotoxina permitida.

del termómetro clínico en conejos.- Es muy frecuente utilizar el teletermómetro en la prueba por conejo, haciendo alusión a que no afecta los resultados por manipulación de los animales; en este trabajo se utilizaron indistintamente los dos sistemas, no observándose ninguna variación en el termómetro clínico, si éste es aplicado adecuadamente, Además el mantenimiento del teletermómetro no es equiparable en costo al gasto que involucra utilizar solo termómetro clínico; seguramente en casos de desarrollo de otras

as sea conveniente la aplicación del teletermómetro, pero en el caso de la prueba oficial ya establecida, aporta ayuda en su facilidad de operación y sencillez, pero con la desventaja que en ocasiones los animales se retiran y es necesario insertarlos nuevamente.

Costo del L.A.L. en México.- Por las devaluaciones de nuestra moneda con respecto al dolar americano se ha afectado el costo de L.A.L. comercial ya que éste es importado; un estuche de 50 pruebas que en marzo de 1982 costó alrededor de \$ 3 500.00, en el mes de marzo 1985 tiene un costo de \$ 642.00 estando su costo determinado mediado por la paridad del peso frente al dolar; sin embargo resulta más económico la compra del reactivo en México que su importación (en el caso de Mallinckrodt).

Cod principalmente y Difco son más económicos en el extranjero.

(A.).

Prueba del L.A.L.- Al hablar de la sencillez de la prueba de L.A.L., se debe señalar que es una prueba muy delicada. Variaciones tales como modificaciones de temperatura, vibración, dosificación, agua de reconstitución, manipulación de endotoxina, etc, van a influir en el resultado final; por tanto es necesaria la validación de todo el equipo para asegurar que los resultados que se obtendrán con correctos, así como seguir rigurosamente la técnica señalada por el protocolo del fabricante del L.A.L.

Es conveniente para realizar las diluciones de la endotoxina el uso de pipetas y matraces volumétricos, y para dosificar (el 0.1 ml requerido de muestra y L.A.L.) el uso de jeringas de vidrio para insulina; con lo cual se va a obtener menor variación en los resultados por un sistema de trabajo que limita las fallas.

-- Tiempo requerido para la prueba L.A.L.

Una ventaja señalada en el uso del L.A.L. es el poco tiempo que consume (1 hora) sin embargo, hay que tomar en cuenta que a lo que se refiere es a una hora de incubación comparada con 3 ó 4 horas de la determinación de temperaturas a conejos, pero también se requiere el preparar el material previamente (despirogenización) y las muestras para su análisis (dilución y ajuste de pH), al igual que en los conejos; la preparación del control positivo también se lleva tiempo ya que no se deben realizar diluciones mayores de 1 a 10, partiendo de 500 mcg/ml para llegar a 12.5 ó 6.25 pg/ml, implica realizar alrededor de 12 diluciones, las cuales tienen que realizarse en el mismo día en que se hace la prueba, esto es debido a la inestabilidad de las endotoxinas en soluciones muy diluidas.

-- Dilución de Parenterales de bajo volumen:

Como se mencionó anteriormente, el agua con que se trabaje en la prueba L.A.L. debe de ser de muy alta calidad, ya que si no es así se tendrán problemas y afectarán, por lo tanto, los resultados: Los parenterales de bajo volumen requieren para su análisis el ser diluidos, y con los factores de las Máximas Diluciones Válidas observadas, obtenemos que se requiere gran cantidad de agua para su análisis; esta agua no es fácilmente asequible, ya que de la calidad requerida solo el proveedor la produce, pero no tiene la posibilidad de venderla, y otras fuentes de agua no la venden explícitamente para la prueba L.A.L. con lo cual hacen dudoso su uso (experimentalmente dió problemas); por lo tanto como el proveedor observa el agua no es posible obtenerla en los niveles requeridos sin que el lograrlo implique un muy buen esfuerzo de convencimiento y la inseguridad

debe de venir con la cantidad suficiente; sin embargo, el proveedor
cancelando en este sentido.

CAPITULO V
C O N C L U S I O N E S

- 1) Se observa una relación directamente proporcional entre el \ln de la dosis y el incremento en temperatura, con una buena correlación entre los puntos que definen esta recta (0.94), tomando en consideración que se trata de un ensayo biológico.
- 2) Los conejos mostraron una respuesta pirogénica característica a dosis de 1.67 ng/kg de peso (DE_{50}), considerando la equivalencia de dosis por Kg. de peso corporal en humano, se considera esta dosis de endotoxina de E. coli 055:B5 como pirogénica en humano.
- 3) Los puntos finales obtenidos en la prueba L.A.L. indican que los productos probados son compatibles con la prueba, mostrando reproducibilidad en los resultados.
- 4) Existe completa correlación en la prueba del L.A.L. y conejo para los productos evaluados.
- 5) Se requiere fijar un límite de endotoxina en agua para inyectables, dependiendo de el uso a el cual está destinado tal producto.
- 6) La prueba del L.A.L. en México comparándola con la de conejo no es tan económica como la cita la literatura. (Es función del

terio instalado y del número de pruebas sometidas en cada ocasión por L.A.L.)

La prueba del L.A.L. es válida para determinar endotoxinas en los productos trabajados, en sustitución a la prueba en conejo, ésta siempre y cuando sea realizado de acuerdo con los siguientes puntos:

La prueba debe ser realizada por una persona capacitada para manejar la prueba del L.A.L.

Validar a dicha persona y al laboratorio en la realización de la prueba.

Determinar la sensibilidad del reactivo L.A.L.

Calcular la MDV del medicamento a probar.

Ajustar el pH del medicamento.

Diluir el medicamento a la MDV.

Preparar control positivo.

Preparar control negativo.

Seguir la técnica general para el L.A.L.

Interpretar los resultados.

BIBLIOGRAFIA

- denal L.
 cionario Terminologico de Ciencias Médicas
 Edición.
 vat Editores, S.A.
 paña 1960.
 . 944.
- ich P. Alberto
 cionario Medicobiológico University
 Edición
 torial Interamericana
 xico 1966.
 g. 890.
- lman José
 rmacotecnia Teórica y Práctica.
 Edición
 paña Editorial Continental, S.A.
 xico 1981
 l. 5
 g. 1380.-1401.
- urdon Kenneth, Williams Robert.
 icrobiología
 Edición en Español.
 ublicaciones Cultural, S.A.
 exico D.F. 1980
 ág. 407-409.
- avis Bernard
 icrobiology
 a. Ed.
 S.A. 1973.
 ág. 635 - 639

Dr. Michael

Microbiology

4th Ed.

McGraw Hill Book Company

U.S.A. 1977

pag. 502-504

Greisman Sh. E. Hornick, R.B.

Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 131 1154 (1969).

Cooper James, Levin Jack

Quantitative Comparison of in vitro (LAL) and in vivo (Rabbits) Methods for the detection of endotoxin.

J. Lab. Clin. Med. 78, 138 (1971).

Cooper J. F. and Pearson Susan

Detection of endotoxin in biological products by the Limulus Test. International Symposium on pyrogenicity innocuity and toxicity.

Test systems for Biological products, Budapest 1976.

Develon. Biol. Standard. 34, 7-13 (1976).

0) Coper J. F.

Principles and Applications of the Limulus Test for Pyrogen in Parenteral Drugs.

Bull. Par. Drug Association 29, 126 (1975).

1) Harkness William, Vos Bert.

Comparison of the Effects of Injection of Pyrogenic Solutions by Intravenous and Intramuscular Routes.

J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed. 39, 413 (1950).

2) Pearson F.C.; Weary Marlys

The Significance of Limulus Amebocyte Lysate Test Specificity on the pyrogen evaluation of parenteral Drugs.

J. Par. Drug. Assoc. 34, 103 (1980).

cos S. Anselmo (Luke).

udies on Bacterial Pyrogenicity II.

Am. Pharm. Assoc. *Sci.*, Ed., 9, 616 (1960)

per J.F. Neely M.

idation of the L.A.L. Test for end product evaluation.

rmaceutical technology, June, 1980.

ch H, Calver, H, Mac Closkv W.T., Price C.W.

nod of Preparation and Test for

terial Pyrogen.

Am. Pharm. Assoc. 32, 65 (1943).

losky W. Price C, Van Winkle W. Welch H.

ults of First U.S.P. Collaborative Study of Pyrogens.

Am. Pharm. Assoc. 32, 69 (1943).

. Walther ·

Quantitative Assay Method for Pyrogens

Am. Pharm. Assoc. 38, 179 (1949).

dy R. J., Oswald Nielben J.K.

otent Pyrogenic Extract Derived from a strain of *Aerobacter aerogenes*

Am. Pham. Assoc., 46, 686 (1957).

tor G., Kantor N., Knoll E., Blakey J.

racteristics of a Highly Purified pyrogenic lipopolysaccharide

Pharm. *Sci.* 60, 1578 (1971).

Noordwijk J., De Jong Y.

parison of the Limulus Test for endotoxin with the Rabbit Test

pyrogens of the European Pharmacopoeia.

Biol. Standar. 4, 131 (1976).

A Colaborative Study for the Pyrogenicity Evaluation of

erence Endotoxin by the U.S.P. Rabbit Test.

IA Document Series, vol. 1 No. 7, Healt Industry Manufacturers Associa

n, Washington, D.C. 1979.

- 22) Response to Food and Drug Administration.
Draft Guideline for Use of Limulus Amebocyte Lysate.
Information Bulletin No. 3, Par.
Drug. Assoc. Philadelphia, p. 7 (1980).
- 23) Bangham D.
The Pyrogen test problem
International Symposium on Pyrogens, university College, London
(1975).
- 24) Mascoli C.C.
Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test for Detecting Pyrogens in
Parenteral Injectable products and Medical Devices; Advantages to
Manufactures and Regulatory Officials.
J. Parenteral Drug. Assoc. 33, 81 (1979).
- 25) Cooper J., Pearson S.M.
Detection of endotoxin in Biological Products By the Limulus Test.
International symposium on Pyrogenicity, Innocuity and Toxicity
Test for Biological products, Budapest 1976.
Devl. Biol. Standar; 34, 7 (1976)
- 26) Levin J., Bang F.
Clottable protein in Limulus: Its
Localization and Kinetics of its
by endotoxin.
Thromb. Diath. Haemorrh; 19, 186 (1968).
- 27) Mills Donald
"Pyrogent (LAL) for detection of endotoxins" Mallinckrodt, Inc' (1978)
Pag. 5-7.
- 28) Nakamura S., Takag, T., Iwanaga S, Niwa M.
Amino Acid Sequence Studies on the Fragments Produced from
Horseshoe Crab Coagulogen During Gel Formation: Homologues With
primate Fibrinopeptide B. Biochemical and Biophysical Research
Communication 72 (3) . 902. (1976).

James F. Cooper

Formulae For Maximum Valid Dilution.

Endotoxins and their detection with the
Limulus Amebocyte Lisate Test.

pag. 55 - 64.

Cooper J., Hochstein H.

The Limulus Test for endotoxin (pyrogen) in Radiopharmaceuticals
and Biologicals.

Bull. Parent. Drug Assoc. 26,153 (1972).

Munson Terry

Endotoxins and their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test.

Alan R. Liss. Inc., N y 10011, 1982 page 25 - 32

Goodman, Gilman

Bases farmacológicas de la Terapéutica.

5a. ed.

Editorial Interamericana.

México, D.F. 1980.

Pág. 1307.

Ama Drug Evaluations

3a. Ed.

Publishing Sciences Grova, Inc.

Little ton, Massachusetts.

page. 194.

Pollit N. t. (Letter)

Large Intravenous Dosage of thiamine

J. Am. Med. Ass., 203, 153 (1982)

Dinareello C.A.

Production of Endogenous Pyrogen

Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 38,52 (1979)

- 36) Wachtel R.E., Tsuj. K.
Comparison of Limulus Amebocyte Lysates and Correlation with the
United States, Pharmacopeal Pyrogen Test.
Applied and Environmental Microbiology 33,1265 (1977).
- 37) Kruger D.
The Detection, of Pyrogens with the Limulus Test.
Drugs Made in Germany 25,12 (1982).
- 38) Ama Drug Evaluations
American Medical Association
4 Ed.
John Wiley & Sons inc
Pag . 63.
- 39) Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos
4a. Ed.
México 1974. pág. 199.
- 40) The United States Pharmacopeia XX
U.S.A. 1980
United States Pharmacopeial Convention, Inc. pág. 902.
- 41) British Pharmacopea
England 1980
H.M.S.O. pág. A 153.
- 42) Pharmacopée Francaise
IX Edition.
Deuxième Partie
1975 - France
p. 235-238
- 43) European Pharmacopoeia
Council of Europe
Vol II - 1971
Maisonneuve S.A.
France
p. 58-60

44) Pharmocopea Helvética.

Editio Sexta

Edizione Italiana

1971

p. 213.

45) Cooper James F.

New Reference Endotoxin Ends Uncertainty in LAL Reagent Labeling.

PEMC Indus, 1,43 (1982)