



300627
15
2ij

Universidad la Salle

**Escuela de Química
Incorporada a la U.N.A.M.**

**" Estudio Monográfico Sobre Ensayos
de Pirogenos Bacterianos "**

TESIS PROFESIONAL

Que, para obtener el título de :

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

Blanca Ines Navarrete Duarte

Asesor: Q.F.B. Martha Mustre de León

México, D.F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

A Dios

Por darme la vida y hacerme sentir que siempre
habrá un mañana mejor, lleno de esperanza para ser--
feliz.

A Mis Padres

Gracias, ya que ustedes han estado siempre al ----
pendiente de mí, quiero que sepan que esta tesis es el--
mejor regalo que puedo hacerles porque nunca tendré ----
con que pagarles las atenciones, apoyo, preocupación ---
y sobre todo la confianza que me han dado, espero no ha-
berlos defraudado. Papá, por tu confianza, amor, enze---
ñanzas y fortaleza. Mamá, por tu cariño y fé.

Hermano

Porque hemos compartido una vida juntos, con momentos buenos y malos, sonriendo y llorando, gracias -- por estar conmigo y apoyarme.

A mis Tios y Tias, paternos y maternos por su confianza-- apoyo y cariño, gracias por estar siempre conmigo.

DEDICATORIA ESPECIAL

A mis Abuelitos Amado y Otilia
Con todo cariño su nieta les dedica esta tesis que --
para ella es un triunfo y que espera que para ustedes--
sea satisfacción y orgullo. Gracias por su amor y apoyo.

Mi agradecimiento sincero a los Q.F.B. MARTHA MUSTRE ---
DE LEON, JOSE LUIS IBARMEA AVILA, ANGELINA OCHOA ISLAS,
JOAQUIN GONZALEZ ROBLEDO y LETY LINARES , por haber ----
sido mis asesores, revisores pero lo más importante --
por haber sido mis amigos.

A LA UNIVERSIDAD LA SALLE

Por haber reforzado mis valores humanos y por dejarme-
ser parte de ella. Gracias.

INDICE

OBJETIVOS	I
INTRODUCCION	II
CAPITULO I. PIROGENOS	1
1.1. Definición	1
1.2. Historia	2
1.3. Origen bacteriano de los pirógenos	4
1.3.1. Endotoxinas y exotoxinas.....	4
1.3.2. Características pirogénica de una endotoxina	8
1.4. Localización del LPS lipopolisacárido en la membrana celular	9
1.5. Estructura de LPS lipolisacarido	11
1.6. Origen de la contaminación por pirógenos	14
1.7. Mecanismos de la respuesta pirogénica	16
CAPITULO II. DESPIROGENIZACION	20
2.1. Despirogenización de soluciones.....	26
2.1.1. Método de filtración.....	26
2.1.2. Tratamiento con agentes oxidantes.....	27
2.1.3. Método con resinas de intercambio iónico.....	29
2.1.4. Osmosis inversa	31
2.1.5. Hidrolisis por ácidos y bases	31
2.1.6. Carbón activado	32
2.2. Despirogenización de envases y materiales de trabajo.....	34
2.2.1. Esterilización	35

INDICE

2.2.1.1. Calor seco	36
2.2.1.2. Calor húmedo.....	36
2.2.2. Dilución.....	37
2.2.3. Atracción y modificación de carga	37
2.2.4. Atracción hidrofóbica a un medio hidrofóbico	38
2.2.5. Destilación.....	38
2.2.6. Sephadex-Lal	39
2.2.7. Alquilación	40
2.2.8. Radiaciones y ondas ultrasónicas	40
CAPITULO III. ENSAYO DE LIMULUS	42
CAPITULO IV. ENSAYO IN VIVO EN CONEJOS.....	70
4.1. Prueba farmacopeica para la detección de pirógenos	70
4.2. Condiciones del bioterio	72
4.3. Procedimiento del ensayo.....	74
4.4. Interpretación de los resultados	76
4.5. Consideraciones sobre el ensayo	78
CAPITULO V. COMPARACION DE METODOS	80
5.1. Compatibilidad de los métodos	80
5.2. Comparación de los métodos.....	86
5.3. Discusión sobre las ventajas y desventajas de los métodos	90

INDICE

CONCLUSIONES 93

BIBLIOGRAFIA 97

INTRODUCCIÓN.

OBJETIVO

El presente trabajo tiene como objetivo general contrastar el método in vivo con el método in vitro, para la determinación de pirógenos, presentando objetivamente sus ventajas y limitaciones, así como realizar una revisión para conocer el estado actual de las investigaciones, sus progresos y perspectivas.

INTRODUCCIÓN.

INTRODUCCION

En la industria farmacéutica se preparan un gran número de productos de administración parenteral utilizados principalmente a nivel hospitalario. En la preparación de estos productos y en limpieza de los equipos que intervienen en su manufactura se utiliza sin duda en gran proporción el agua. Este solvente tiene como propiedad principal el disolver prácticamente todas las sustancias, por esto mismo fácilmente se contamina. (1, 35).

Uno de los agentes contaminantes son los pirógenos. La administración de fármacos inyectables contaminados por pirógenos pueden producir: fiebre, escalofrío, leucopenia y otras manifestaciones. Por lo anterior es necesario que estos productos farmacéuticos sean sometidos a diversas pruebas que aseguren la ausencia de pirógenos y así garantizar la protección de los pacientes a los que se les administran (2).

Dos técnicas son las que principalmente se aplican para determinar la contaminación por pirógenos en productos parenterales, así como en los envases en los que se depositan al final del proceso.

INTRODUCCIÓN.

La primer prueba para detectar pirógenos se basa en el registro del aumento de temperatura en el conejo, como respuesta a la presencia de agentes pirogénicos, ya que la reacción fisiológica del conejo a estos agentes es muy similar en el hombre (1, 32, 2, 38). Este bicensayo a pesar de ser la prueba oficial está sometida a una serie de variantes como son. dosis, sensibilidad de los animales, costo y sustancias que no pueden ser ensayados por este método.

Por estas variables, se han buscado otras alternativas que presenten rapidez y eficacia para determinar pirógenos; la reacción de lisado del amebocito de *Limulus* (conocida como prueba de LAL) es una de ellas. Este es un ensayo que detecta de forma rápida y precisa la presencia de pirógenos en los equipos de manufactura de productos parenterales y en productos acuosos, por lo que es un arma útil para validar procesos de despirogenización (46, 32) además de tener un costo menor, no depende de la dosis y requiere de menor tiempo para su realización (3).

Algunos de los métodos de eliminación de pirógenos son: ultrafiltración, osmosis inversa, membranas micropor o hidrofóbicas, cromatografía de afinidad, destilación, filtración por carbón activado, etc. Por otro lado se puede provocar la inactivación de los pirógenos por los siguientes métodos calor, ácidos y bases diluidos, oxidación, alquilación, radiaciones (32).

INTRODUCCIÓN.

En el presente trabajo se hizo un estudio comparativo de ambos métodos de detección pirogénica presentando sus ventajas y limitaciones y realizando al mismo tiempo una revisión de las investigaciones más recientes de ellos.

CAPITULO I. PIROGENOS

1.1. DEFINICION

Los pirógenos son sustancias que inducen la reacción febril cuando se administran a animales por varias rutas, incluyendo la vía intravenosa (30). Cuando se inyectan en el hombre en suficientes cantidades pueden provocar diversas respuestas fisiológicas (Tabla 1), la respuesta más común es el incremento de temperatura por lo cual se deriva el nombre de "pirógeno" (Pyro = fuego; geno = origen) (1,30,33,73).

Los pirógenos son producto del metabolismo de microorganismos (41).

Respuestas Primarias	Respuestas secundarias
1. Incremento de temperatura	1. Vasodilatación cutánea
2. Vasoconstricción cutánea	2. Hiperglucemia
3. Disminución de la respiración	3. Disminución de la presión arterial
4. Aumento de la presión arterial	4. Defecación involuntaria
5. Nausea y malestar	5. Disminución de la motilidad y secreción gástricas
6. Diarrea severa	6. Lecocitopenia y lencocitosis
7. Dolor en brazos y piernas	7. Hemorragia y necrosis tumorales
8. Dolor de cabeza	8. Disminución de glucógeno en hígado
	9. Aumento de nitrógeno no proteico y ácido úrico en sangre

Tabla 1. Efectos adversos fisiológicos de pirógenos en el hombre (12).

1.2. HISTORIA

La respuesta pirogénica se ha conocido desde 1865 cuando se reportó que una inyección de agua destilada produjo hipertemia en perros (2,32).

En 1876, la presencia de una sustancia productora de fiebre llamada "pirógeno" por vez primera, se detectó en pedazos de comida putrefacta.

En 1879 Sir Burden Sanderson, introdujo el término "pirógeno" para designar al compuesto responsable de la fiebre, que se presentaba comúnmente después de una transfusión sanguínea.

Por mucho tiempo, se definió a los pirógenos como: "sustancias de naturaleza desconocida, probablemente proteica, que se encuentran en el agua destilada utilizada en la preparación de sustituyentes sanguíneos y responsable de la elevación ocasional de la temperatura corporal, después de la transfusión de sangre o de otros fluidos por vía intravenosa (3).

La identificación de los componentes pirogénicos de bacteria fue realizada por Roussy en 1889 y Centanni en 1894, quienes determinaron que los pirógenos no son de origen proteico.

PIRÓGENOS.

Hort y Penfold en 1991 hicieron significativas contribuciones en relación a la producción de fiebre y la administración de infusiones intravenosas. También fueron los primeros en usar conejos como modelo animal para el estudio de la respuesta pirogénica, observando que la incidencia de fiebre producida por una inyección intravenosa disminuía considerablemente si se utilizaba agua recientemente destilada como solvente en la inyección (44).

Es necesario hacer notar que mientras el significado médico del pirógeno era reconocido durante todos esos años, no fue sino hasta 1923 que Florence Seibert recomendó que todos los farmacéuticos realizaran pruebas para pirógenos. Controló cuidadosamente sus experimentos, confirmando los resultados de Hort y Penfold usando conejos como modelo animal para detectar la presencia de pirógenos en inyectables. También demostró que los pirógenos de origen microbiano de agua son termoresistentes y pueden ser eliminados por destilación.

Cotui y Schrifft reportaron que las características de los pirógenos producidos por los microorganismos dependen del tipo de organismos y que los pirógenos bacterianos están relacionados a los lipopolisacáridos.

Las pruebas de pirógenos fueron hechas como pruebas oficiales de control de calidad de parenterales en 1942 en la United States Pharmacopeia (USP) XII.

PIRÓGENOS.

Después en 1945, el Código de Regulaciones Federales (CFR títulos 21, sección 610.13 para biológicos y las secciones 436.31 y 436.32 para antibióticos) requirió prueba de pirógenos para antibióticos (44, 46).

A pesar de los avances en la ciencia parenteral y la tecnología a través de los años, la prueba de conejo para pirógeno es una metodología oficialmente reconocida y permanece esencialmente sin cambios. Se basa en la respuesta febril de conejos. Los conejos son utilizados como el animal de prueba debido a que ellos tienen o presentan una respuesta fisiológica a los pirógenos similar a los humanos (41).

1.3. ORIGEN BACTERIANO DE LOS PIROGENOS

1.3.1. ENDOTOXINAS Y EXOTOXINAS

Las bacterias pueden presentar exotoxinas o endotoxinas según sea su carácter Gram positivo o Gram negativo. Las endotoxinas son pirogénicas, mientras que las exotoxinas no tienen carácter pirogénico.

Las exotoxinas son un grupo de venenos químicos secretados por bacterias patógenas Gram positivas principalmente. Una exotoxina se puede transformar en

PIRÓGENOS.

toxide, neutralizando su acción tóxica, y son de gran interés en la producción de vacunas (8,46) Ver tabla 2.

Las endotoxinas son sustancias constitutivas de las membranas celulares de las bacterias Gram negativas y se caracterizan por ser termoestables y tener origen lipopolisacárico (9, 46).

Las endotoxinas son una familia de sustancias lipopolisacáridas asociadas a la membrana externa de una bacteria Gram negativa y manifiestan numerosos efectos tóxicos en el hombre incluyendo la pirogenicidad (Tabla 1) (16, 46, 32, 34).

En la siguiente tabla se condensan las características de una endotoxina y una exotoxina:

PIRÓGENOS.

Exotoxina	Endotoxina
Presente principalmente en bacterias Gram positivas	Presente en bacterias Gram negativas
Producto metabólico del crecimiento celular	Presente en lipopolisacárido (LPS) de membrana externa de la pared celular y relacionada solo con la destrucción celular
Origen proteico o péptido pequeño	Porción lipídica
Inestable al calor usualmente se destruye a 60° - 80°C	Termoestable
Alta toxicidad	Baja toxicidad
Puede convertirse a toxoide, se neutraliza por la antitoxina	No es fácilmente neutralizable por antitoxina, sin embargo no es un efectivo toxoide
Efecto farmacológico específico para cada célula	Pirogénico

Tabla 2. Comparación entre una exotoxina y una endotoxina (46).

PIRÓGENOS.

Los productos microbianos presentan una conocida actividad estimulante. Para bacterias Gram positivas, las paredes celulares están compuestas en su mayoría por peptidoglicanos, y son responsables en su mayoría de su actividad inmunoestimulante. Las bacterias Gram negativas poseen sólo una cantidad límite de peptidoglicano y no de ácidos teicoicos. Su membrana celular externa consiste de bicapas de lípidos las cuales son ricas en oligo y polisacáridos los cuales tienen propiedades tóxicas e inmunológicas (10, 37).

Estos productos junto con otras sustancias microbianas inmunomodulatorias se presentan en la tabla 3.

Sustancia	Fuente	Actividad
Lipopolisacárido	Bacterias Gram negativas	Variada, afecta varios sistemas
Peptidoglicanos	Bacterias Gram positivas; presentes en pocas cantidades en Gram negativas	Varias
Acido Lipoteicoico	Bacteria Gram positiva	Varias
Proteína exotoxina	<i>Bordetella pertussis</i>	Altera el balance de células T.
Enterotoxina termoestables	<i>E. coli</i>	Modula IgM-LgG
Exotoxinas pirogénicas	<i>Streptococos</i>	Similar a TSST-1
Tóxina del síndrome de shock (TSST-1)	<i>Staphylococo</i>	Mitogénica de célula T Estimula macrófagos

Tabla 3. Productos microbianos con actividad inmunoestimulante (10).

1.3.2. CARACTER PIROGENICO DE UNA ENDOTOXINA

Los pirógenos provienen de los microorganismos. Todas las formas microbianas producen pirógenos, sin embargo las únicas que tienen mayor potencia pirogénicas son aquellas endotoxinas que son producidas por bacterias Gram negativas y que tienen origen polisacárido. Por lo anterior, suele utilizarse el término LPS como ENDOTOXINA (32,47).

En la actualidad se tienen plenamente identificados a los agentes pirogénicos. Estos compuestos incluyen: bacterias y sus toxinas, hongos, virus, espiroquetas, hormonas, drogas (47).

Un pirógeno es una sustancia que causa un aumento de temperatura cuando es inyectada. Son complejos asociados de lipopolisacáridos (LPS) de alto peso molecular, asociado con la pared celular de bacterias Gram negativas, son referidos como "endotoxinas" (19,47).

Las moléculas de endotoxinas en solución pueden existir en diferentes estados de agregación. En la mayor forma de agregación en presencia de magnesio o calcio, existen unidades con un diámetro mayor a 0.1µm. La adición de agentes quelantes rompe los agregados en subunidades, c/u con un diámetro de 8-12 Å, con un peso

PIRÓGENOS.

molecular de 300,000 a 1,000,000. Las endotoxinas en algún estado de agregación pueden ser removidas por ultrafiltración (3).

1.4. LOCALIZACION DEL LPS (LIPOPOLISACARIDO) EN LA MEMBRANA CELULAR

Como ya se había mencionado las endotoxinas o LPS se encuentran en bacterias Gram negativas, en su superficie celular (76).

En la siguiente figura se han representado las 3 capas celulares de las que consta la pared celular de un organismo Gram negativo.

Se observa que la membrana externa se compone de una línea de proteína-lipopolisacárido y fosfolípidos, luego una delgada de 20 a 30A° de espesor que corresponde a la pared celular y por último de una capa interna que corresponde a la membrana citoplasmática (16).

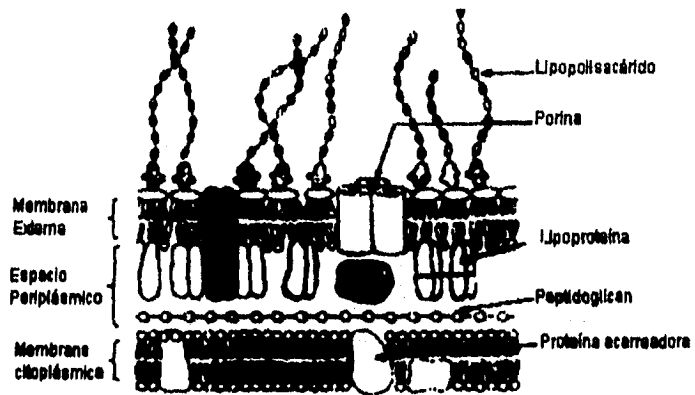


FIG. 1 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA MEMBRANA CELULAR
GRAM NEGATIVA (43).

1.5. ESTRUCTURA DEL LPS (LIPOPOLISACARIDO)

El lipopolisacárido está conformado de la siguiente forma (10, 38, 34):

- a) Antígeno "O" específico o cadena polisacárida
 - b) Core o polisacárido central
 - c) Lípido A
- a) Antígeno "O" específico. Está formado por cadenas que contienen una misma secuencia repetitiva, en la que la subunidad puede ser un trisacárido lineal o un tetra o pentasacárido ramificado (10).

Entre los azúcares presentes en esta fracción del LPS se encuentran: glucosa, galactosa, ramosa, glucosamina, L y D -fucosamina y D-viosamina (36, 18).

La longitud de esta cadena es variable, incluso en un mismo microorganismo y puede alcanzar hasta 25 unidades repetitivas. El antígeno "O" es un polisacárido que determina la especificidad de la bacteria. Generalmente es una cadena lineal, pero pueden observarse ramificaciones hacia los lados. Lo que determina la diferencia en cada bacteria es lo largo y la composición de las unidades repetitivas (36, 19, 20).

PIRÓGENOS.

b) Core o polisacárido central.

Está compuesto por azúcares, grupos fosfato y etanolamina. Este polisacárido central está formado por 2 moléculas de heptosa unidades; por un lado azúcares comunes como glucosa, galactosa o glucosamina y por otro lado unidas a 3 residuos de un azúcar ácido de 8 carbonos conocido como ácido 2-ceto-3-desoximano octulosónico (KDO) (17).

El core une a la cadena "O" con el lípido A (figura 3).

c) Lípido A. Es la parte más interna del lipopolisacárido. Está formado por los siguientes ácidos grasos: ácido 3-hidroximirístico, ácido mirístico, láurico y palmítico (13, 14, 36) y por azúcares como: glucosamina; además de fosfatos y etanolamina (12). Los ácidos grasos están conectados por un enlace esteréico a la glucosamina.

Así tenemos entonces que el lípido A es un glucofosfolípido constituido por unidades de glucosamina, formando cadenas de disacáridos de 3-1,6-D-glucosamina enlazados por puentes 1,4- pirofosfato, (figura 2) (42).

Tres de los grupos hidroxilo del disacárido de glucosamina se encuentran esterificados con el ácido láurico, palmítico y mirístico, mientras que en la posición

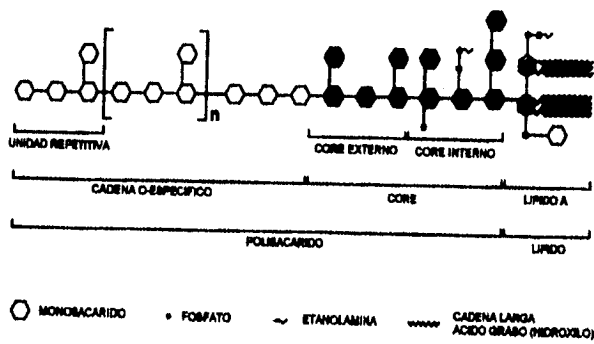


FIG 3 ESTRUCTURA DEL LIPOPOLISACARIDO (38)

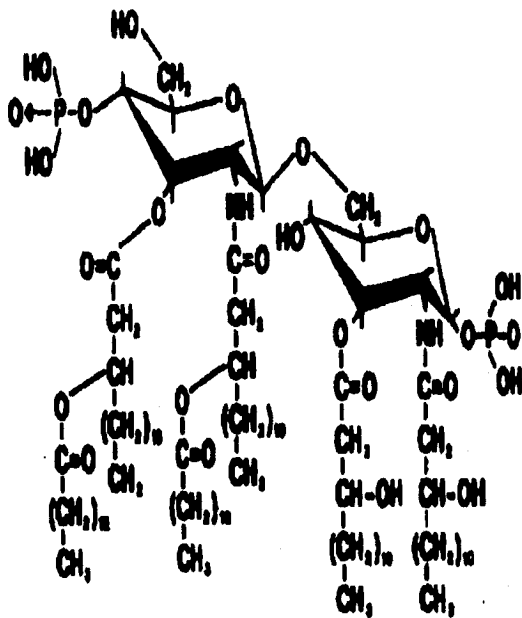


FIG. 2 ESTRUCTURA DEL LIPIDO A (38)

PIRÓGENOS.

3 se encuentra unida la porción polisacárido o core del LPS (12, 32, 34) y es la parte que presenta la actividad biológica (toxicidad) (15).

1.6. ORIGEN DE LA CONTAMINACION POR PIROGENOS

Cuando los pirógenos aparecen en productos parenterales, pueden provenir de 2 fuentes:

- a) Del agua utilizada como solvente.
- b) Los contenedores con los cuales tiene contacto la solución durante su preparación, envasado, almacén, administración o químicos utilizados en la preparación de la solución (40, 44, 45).

La formación o producción de pirógenos, puede entonces deberse a una contaminación por microorganismos, bacterias, hongos, virus; del agua o de las drogas que se usan. Pero a pesar de los cuidados que se tengan para eliminar a los pirógenos, todavía pueden ocurrir reacciones debidas al inadecuado manejo de los recipientes en que se elaboran, las cañerías, envases, jeringas (40, 44, 35).

Los pirógenos son removidos del agua por medio de destilación. El agua destilada libre de pirógenos es colectada en contenedores estériles y libres de pirógenos; si

PIRÓGENOS.

estos contenedores no están libres de pirógenos, los pirógenos del contenedor son disueltos en el agua convirtiéndose en pirogénica. Si el contenedor no es estéril los microorganismos presentes crecen y producen pirógenos dando como resultado un solvente pirogénico (35, 39, 44).

Un sistema de agua mal diseñado puede traer consigo la contaminación de tuberías y tanques de almacenamiento. Una falta de sanitización y mantenimiento de las tuberías, filtros, etc., puede provocar proliferación de microorganismos (35).

Los sistemas de intercambio iónico han sido reconocidos por la USP como una fuente importante de contaminación microbiana ya que si las resinas no son regeneradas o sanitizadas regularmente, los microorganismos pueden establecerse y proliferar en grandes proporciones las cuales producen pirógenos u otros metabolitos.

El filtro de carbón representa uno de los puntos más vulnerables para la proliferación microbiana ya que el carbón provee una rica fuente de nutrientes (35).

Los factores que usualmente podrían agravar los problemas de contaminación microbiana en el agua incluyen:

PIRÓGENOS.

- Condiciones de estancamiento.
- Temperatura ambiente.
- Mala calidad del suministro de agua.
- Diseño inapropiado del sistema de suministro de agua (35, 44, 32).

Los químicos usados en la preparación de productos parenterales pueden ser fuente de pirógenos, sin embargo ésta no es una fuente común de contaminación. Los químicos de fuentes naturales o que fueron preparados por procesos de fermentación, incluyendo dextrosa, fructosa, citrato de sodio, sales de fosfato, aminoácidos y heparina, pueden ser pirógenicos. Cuando se ha establecido que un químico es pirogénico es mejor utilizar otro lote (45, 44).

1.7. MECANISMO DE LA RESPUESTA PIROGENICA

Las toxinas bacterianas son una serie de compuestos residuales tóxicos, producto del metabolismo bacteriano cuyo principal y más potente efecto biológico es su capacidad para producir una respuesta febril, cuando llegan al sistema circulatorio del paciente. En algunos casos, esta reacción es tan leve que incluso puede pasar desapercibida y por lo tanto es inofensiva; pero en otros, pueden adquirir extraordinaria gravedad y se acompaña generalmente por una respiración deficiente,

PIRÓGENOS.

cianosis, dolor de cabeza, sudor intenso, escalofrío, náuseas, vómito y otros trastornos gastrointestinales pudiendo llegar hasta el shock y la muerte (5).

Sin embargo, la fiebre no comienza sino hasta después de un período de 30 minutos debido a que la endotoxina no es el agente directo de la fiebre (Ver figura 4).

La fiebre es la más característica sintomatología de una infección. La fiebre es aparentemente inducida por un mecanismo o señal química en los centros de regulación de la temperatura en el cerebro. Como se vio anteriormente, las sustancias que inducen la fiebre se denominan pirógenos (73).

Cuando la endotoxina entra en la circulación sanguínea, es fagocitada por leucocitos, monocitos, macrófagos tisulares y células endoteliales de Kupffer y hepatocitos del sistema inmunológico, induciendo la producción de una sustancia endógena (Pirógeno, endógeno o leucocitario o interleucina-1) que será lo que actúe como activador sobre el hipotálamo para producir la fiebre (46, 22,69) (Fig. 4).

Los pirógenos endógenos leucocitarios son proteínas básicas (Interleucina-1) de bajo peso molecular entre 10,000 y 20,000. La producción del pirógeno endógeno se debe a un proceso metabólico, que incluye la formación de factores solubles como las linfocinas que van a ayudar para que se forme el pirógeno endógeno (23).

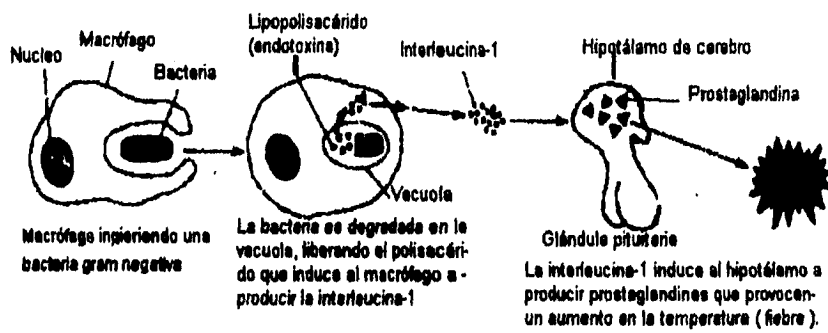


FIG. 4 RESPUESTA PIROGENICA (42).

PIRÓGENOS.

Este mecanismo es bastante complejo ya que el sistema inmune influye en gran medida y todavía existen muchas dudas acerca del mecanismo de liberación del pirógeno. Se cree que el pirógeno se encuentra en la célula como un precursor inactivo y su activación se asocia con la síntesis proteica, después de la cual el pirógeno es liberado al medio extracelular; aunque algunos autores suponen que dicho precursor es activado por una señal o bien que es un proceso genéticamente controlado; ninguno de estos argumentos ha sido totalmente corroborado (24,18).

En general el mecanismo de la producción de la respuesta pirogénica se puede resumir de la siguiente manera: los lipopolisacáridos cuando se introducen a los tejidos incluyendo la sangre, tienen fuerte tendencia a adherirse a los leucocitos y en particular a los macrófagos. Estos al recibir el lip A en su membrana, sufren alteraciones que determinan la síntesis de un "pirógeno endógeno" que se ha reconocido como idéntico a la interleucina 1 (IL-1). Una vez secretada la IL-1 por los macrófagos entra rápidamente a la circulación e interactúa con las neuronas termosensibles del hipotálamo. Acto seguido la temperatura corporal empieza a elevarse en un intervalo de 5 a 10 minutos en animales y 20 minutos en humano (Figura 4)(11).

CAPITULO II. DESPIROGENIZACION

Los pirógenos son peligros no intrínsecos de los fármacos pero que se pueden sumar a los de los fármacos. No dependen de éstos en sí, sino de impurezas disueltas en los líquidos en que se deben disolver los fármacos aunque, previamente hayan sido esterilizados.

Ciertamente algunas veces se produce un desarrollo de bacterias y sus productos pueden pasar los líquidos de disolución (pirógenos) los cuales son capaces de resistir los tratamientos normales de esterilización (64).

La esterilidad del agua es un punto crítico en la elaboración de toda forma farmacéutica, y en especial para los inyectables. Sin embargo, el agua no es la única fuente de contaminantes, el ambiente de los laboratorios, los utensilios de trabajo e incluso las drogas, contienen gérmenes, que se desarrollan y producen pirógenos como ya se mencionó.

Hasta hace poco tiempo el proceso de elaboración de inyectables incluía, la disolución del principio activo, la filtración para la clarificación de la solución, el envasado en condiciones higiénicas y la esterilización del producto final. En la actualidad deben incluirse en este proceso pasos complementarios, tanto para

DESPIROGENIZACIÓN.

prevenir la formación de pirógenos, como para eliminarlos si ya han contaminado las soluciones y así ofrecer un producto sin riesgo (80).

Los pirógenos algunas veces pueden ser removidos de las soluciones por absorción en la superficie de absorbentes seleccionados. Sin embargo para muchas preparaciones farmacéuticas es mejor prevenir la contaminación pirogénica que remover los pirógenos (41).

Como un caso especial de soluciones es apropiado hablar de soluciones parenterales. Los posibles ingredientes en una solución parenteral pueden ser: drogas, preservativos, antioxidantes, complejos metálicos, solubizantes o agentes acomplejantes, agentes isotónicos, buffer y agua libre de pirógenos. El problema específico de los parenterales es que sean estériles y libres de pirógenos (16, 74).

Estos productos requieren una producción muy delicada teniendo como una de las principales consideraciones que estén libres de pirógenos y que el material y equipo utilizado durante su preparación y empaquetamiento se manejen en total limpieza e higiene (40).

DESPIROGENIZACIÓN.

Un punto importante en la GMP (prácticas de buena manufactura) es la calidad del producto durante su procesamiento y empaquetamiento, las pruebas finales son una parte esencial de este proceso.

Los niveles de endotoxina son uno de los indicadores de las medidas de higiene utilizadas para la manufactura (40, 74).

Los pirógenos pueden entrar a un producto de dos maneras:

- a) Pueden introducirse los microorganismos.
- b) O sus productos metabólicos y de crecimiento.

La fuente más común es el agua, soluciones contaminadas y contenedoras.

Como ya habíamos visto anteriormente el agente causal de la pirogenicidad es el LPS de la endotoxina, debido a que este material es termoestable puede permanecer en el agua aún después de la esterilización por autoclave o filtración. Los pirógenos son generalmente solubles en agua pero se adhieren fuertemente a las superficies hidrofóbicas tales como el vidrio (40, 43, 16).

Por estas razones la despirogenización de todas las superficies que tienen contacto con el producto es un parte esencial de los procesos de producción (35).

DESPIROGENIZACIÓN.

Collier y París observaron que una solución fuertemente pirogénica perdía su actividad con el tiempo. El LPS del Staphylococcus aureus, pierde el 57% de su actividad en almacenaje de 10 semanas a 15-22°C. Es posible que ésta pérdida de actividad se deba, según Hartley, a un lento proceso de adsorción por el vidrio. Pero esto no ocurre en todos los casos. Algunos pirógenos no los absorbe el vidrio (44).

Por otro lado, el carbón activado, la fibra de asbesto y las superficies de odipropileno o polietileno absorben pirógenos, tal vez por una interacción hidrofóbica (40, 43, 44).

Los pirógenos absorbidos a estas superficies son más difíciles de remover, algunos pirógenos pueden removerse o eliminarse mediante enjuagues con agua aprotogénica (40).

Muchos metales o superficies de vidrio pueden tratarse químicamente. Algunos agentes oxidantes como el peróxido o permanganato son efectivos. El método preferente de despirogenización de superficies es el calor seco a temperaturas arriba de 160°C, a los 250°C por un intervalo de 30 minutos, se tienen las condiciones adecuadas. Este tratamiento se aplica cuando se asume que la superficie del equipo puede ser calentada y por supuesto muy pocos productos pueden ser tratados por ésta vía (43).

DESPIROGENIZACIÓN.

En la manufactura de agua para inyecciones pueden emplearse algunos métodos apropiados para eliminar a los pirógenos de sus productos. El pirógeno de *E. coli* pierde actividad por el calor a presión reducida. Votava, Vajglova y Sinek demostraron que algunos pirógenos preparados por ellos, al cabo de un año a temperatura ordinaria no cambiaron, pero esterilizados en autoclave disminuyeron su actividad (44). Soluciones con el LPS de Saurens calentadas al vapor (98-100°C por 30 minutos) pierden aproximadamente el 92% de pirogenicidad y en autoclave a 115°C por igual tiempo, el 97%.

Debido a que los pirógenos son sustancias orgánicas, uno de los medios más comunes de eliminación es por su oxidación pudiendo eliminar gases fácilmente o sólidos no volátiles, ambos pueden ser fácilmente separados del agua por destilación fraccionada (42, 43).

Los pirógenos pueden eliminarse por medio de una ultracentrifugación menor a 100 Kd, es un medio efectivo de filtración de endotoxinas, las cuales tienen un peso molecular aproximado de 20 Kd pero están en agregados de unos 1000 Kd mínimo.

La ósmosis inversa también remueve partículas menores a 1 μ m, incluyendo a las endotoxinas.

DESPIROGENIZACIÓN.

Los métodos de despirogenización varían en su eficiencia. Algunos son más recomendables para superficies sólidas que para soluciones, otros son únicamente efectivos en materiales que se ajustan a las condiciones establecidas por los distintos métodos; por lo que el método de despirogenización debe ser elegido, diseñado y ajustado específicamente a cada situación.

Generalmente se utiliza una combinación de 2 o más técnicas. De acuerdo a lo anterior, los métodos para despirogenización se pueden clasificar en dos formas:

1. Despirogenización de soluciones:
 - a) Filtración.
 - b) Tratamiento con oxidantes (oxidación).
 - c) Método con resinas de intercambio iónico.
 - d) Osmosis inversa.
 - e) Hidrólisis con ácidos y bases diluidas.
 - f) Carbón activado.

2. Despirogenización de envases y materiales de trabajo
 - a) Esterilización calor seco, calor húmedo.
 - b) Dilución.
 - c) Atracción y inmodificación de carga.
 - d) Atracción hidrofóbica a un medio hidrofóbico.

DESPIROGENIZACIÓN.

- e) Destilación.
- f) Sephadex-lal
- g) Alquilarción.
- h) Radiaciones y ondas ultrasónicas.

2.1. DESPIROGENIZACION DE SOLUCIONES

2.1.1. METODO POR FILTRACION

El agua es forzada a pasar a través de la membrana filtrante, con poros de diámetro definido, reteniendo las partículas de mayor tamaño con respecto a los poros, en la superficie de la membrana, contribuyendo a la retención de algunas partículas de menor tamaño. Los poros tradicionales tienen un tamaño de 0.22 a 0.45 μm (35).

En 1937 Co Tui y colaboradores observaron que no obstante emplearse agua destilada apirogénica y drogas puras, puede resultar una solución pirogénica si no se adoptan recaudos especiales en los útiles de trabajo y en el proceso de disolución. Por lo anterior aconsejan incluir una filtración por filtro de asbesto ya que ellos trabajaron con distintos tipos de filtros y encontraron que ese proporcionaba mayores ventajas; Rudat confirmó estos resultados (44).

DESPIROGENIZACIÓN.

Según Co Tui la absorción por los filtros depende la concentración de la solución y del tamaño y naturaleza de las moléculas del soluto (44).

Oca Pastor aconseja un tratamiento previo con carbón activado al 0.1% y un pasaje sucesivo a través de distintos filtros. Para prefiltrar recomienda filtros con un poro de 5 a 8 μm , después filtración por asbesto (poro de 0.22 a 0.5 μm) y por último otra más por filtros de vidrio poroso.

Los filtros retienen pirógenos por absorción y son recomendables para cristaloides, soluciones, materias primas de bajo y mediano peso molecular..

Por las condiciones de operación el método de filtración es de los más sencillos y rápidos.

2.1.2. TRATAMIENTO CON AGENTES OXIDANTES

Entre los métodos de oxidación, destaca el basado en el empleo de agua oxigenada; ya que el producto residual del reactivo es agua, de modo que no existe peligro de contaminar las soluciones con agentes extraños.

DESPIROGENIZACIÓN.

El mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno en el LPS es desconocido, la peroxidación de los ácidos grasos presentes en la región del LPS conocida como lípido A se cree que es la forma de acción del peróxido (32).

Taub y Hart (1948) utilizaron peróxido para destoxificar de pirógenos agua para inyecciones, solución salina y soluciones de dextrosa. Determinaron que el tratamiento es más efectivo hirviendo en la presencia de peróxido de hidrógeno al 0.1% por 2 horas. Al final la solución también está libre de peróxido (32, 44).

Además, utiliza poca cantidad de reactivo y a bajas concentraciones (0.1M. x 2 hr. ó 0.04 a 116 °C por 20 min. ó 1% por 2 horas) por lo que no alteran los agentes terapéuticos a las diversas sustancias que integran la solución.

La inactivación por peróxido de hidrógeno depende del tiempo, pH y su concentración.

Este método permite obtener grandes volúmenes de agua para la preparación de soluciones parenterales. Se hierve la solución durante 1 hr. En un balón refrigerante a reflujo previo agregado de 0.02 a 0.10 ml. de agua oxigenada, se adiciona dióxido de magnesio en pequeñas fracciones para descomponer el agua oxigenada que no reacciona; se hierve luego por 5 m. más para eliminar gases y el resto del agua oxigenada.

DESPIROGENIZACIÓN.

En algunos casos, se puede emplear carbón en lugar de bióxido de magnesio, sobre todo para soluciones de glucosa.

Se puede utilizar otro agente oxidante diferente al peróxido de hidrógeno pudiendo tener ventajas. Los otros agentes oxidantes pueden ser el oxígeno molecular, hipoclorito de sodio, ácido peryódico, peryodato de sodio, permanganato de potasio diluido, ácido nítrico y dióxido de selenio. Pero la inactivación por peróxido de hidrógeno ofrece la ventaja de manejar bajas concentraciones (0.1M durante 2 hrs o 0.04M a 116 C durante 20 minutos), además en solución se elimina fácilmente (32).

2.1.3. METODO CON RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO

En el procedimiento general el agua entra al sistema bañando una fuente de luz ultravioleta en un espesor de 1 mm. y se hace pasar a través de un lecho mixto de resinas catiónica y aniónica.

El aparato debe esterilizarse previamente dejándolo una noche en una solución de formaldehído al 1% y pasando luego agua apirógena para enjuagar. Se puede utilizar

DESPIROGENIZACIÓN.

agua corriente, pero se debe ampliar un tratamiento previo con hipoclorito de sodio acidificado para destruir esporas, y que es fácil de eliminar por las resinas.

Esta técnica se basa en considerar que algunos pirógenos tienen carga y por ello son fijados sobre las resinas. Las resinas intercambiadoras más usuales son de Amberlita XE 64 ó IRC 50, Zeocarb 225 y Deacidité FF y Decalso (Sético aluminato sódico).

El empleo de esta técnica para depirogenizar soluciones, ha arrojado resultados irregulares y las farmacopeas no recomiendan el agua purificada por resinas de intercambio iónico para la preparación de inyectables.

Aún así T.D. Whittet (1956) realizó varias modificaciones al método de las cuales se aclaró que algunos pirógenos tienen carga negativa y por lo tanto son captados por la resina aniónica (44, 32).

2.1.4. OSMOSIS INVERSA

El agua sometida a una presión superior a la presión osmótica pasa por la membrana, resultando un agua de alta pureza, mientras que las impurezas se concentran y fluyen como desecho. Retiene con efectividad la mayoría de las partículas como pirógenos, microorganismos y sales inorgánicas disueltas. Requiere de un mínimo mantenimiento. Como desventaja se tiene que se pierde mucha agua durante el proceso, a comparación de otros métodos (35, 44).

Las membranas de ósmosis inversa consisten de acetato de celulosa o material poliamido con poros lo suficientemente pequeños para excluir iones. Las membranas convencionales remueven endotoxinas por simple exclusión de tamaño. Remueve de los 99.5% a 99.9% de pirógenos presentes, por esto es uno de los métodos reconocidos por la U.S.P para la producción de agua para inyectables (32).

2.1.5. HIDROLISIS POR ACIDOS Y BASES

La despirogenización a través de acción hidrolítica reduce o elimina la actividad biológica de las endotoxinas bacterianas por desactivación del lípido A, cuya hidrólisis genera productos sin efecto término.

DESPIROGENIZACIÓN.

El procedimiento general implica acidificar la solución con ácido clorhídrico 0.05 a 0.1N., hasta llevarla a un pH por debajo de 6.5; se agregan 10 g de carbón activado, se agita y se diluye 1:10 se agita nuevamente y se filtra. Se esteriliza de inmediato a 120° durante 1h. 30 min.

Un efecto similar se puede obtener mediante la ebullición de la solución pirogena con ácido clorhídrico 0.1N durante 30 m a 100°C (26).

La hidrólisis ácida actúa en el enlace del lípido A y la región core del LPS, formado por el KDO (ac. 2-ceto-3-desoximano octulosónico). El lípido A libre es insoluble en soluciones acuosa y su actividad pirogénica se reduce o elimina (32).

2.1.6. CARBÓN ACTIVADO

Método por Carbón Activado.

Varios autores describen al carbón por sí mismo como un despirogenizante efectivo pues tiene gran afinidad por sustancias no iónicas y de alto peso molecular. La despirogenización de soluciones se basa en la adsorción física de la endotoxina al carbón activado.

DESPIROGENIZACIÓN.

La cantidad de carbón y el tiempo de contacto dependen del grado de contaminación de las soluciones y del tipo de germen que produce el pirogeno. Una concentración del 5% puede aplicarse quizá en forma genérica a todas las soluciones preparadas en condiciones normales poco contaminadas.

El uso de este agente de adsorción queda limitado a aquellas soluciones que no contengan sustancias adsorbibles como alcaloides, colorantes, etc., y sólo soluciones concentradas de materiales brutos e intermediarios, además de las soluciones fisiológicas electrolíticas pueden trabajarse por este método (32).

Generalmente este método se utiliza como una garantía adicional (aún cuando el agua o el solvente carezca de pirógenos).

Las partículas de carbón residual que permanecen en la solución pueden ser removidas fácilmente por filtración o precipitación.

Otros tratamientos, sobre todo de tipo industrial, basados en el mismo principio refieren el empleo de hidróxido de aluminio exento de alcalis, el efecto desintegrante de la diastasa y a la fijación sobre polivinil pirrolidón de bajo peso molecular.

2.2. DESPIROGENIZACION DE ENVASES Y MATERIALES DE TRABAJO

Para quitar pirógenos del material de trabajo, embudos, cristalería, es preciso someterlo después de un lavado, a un tratamiento con solución de carbonato de sodio hirviendo (puede ser permanganato de potasio), con agua destilada, solución de ácido clorhídrico, agua destilada y agua libre de pirógenos sucesivamente (44).

En el National Center for Antibiotics and Insulin Analysis, dejan el material de vidrio durante la noche en una solución concentrada de fosfato trisódico, después se colocan en la estufa a 200°C - 250°C.

El agua es el vehículo en muchas soluciones medicinales. El agua purificada U.S.P, es agua obtenida por destilación o tratamiento de intercambio iónico.

Los productos farmacéuticos que pueden ser estériles incluyen fluidos de percusión, inyección, soluciones de irrigación, fluidos por uso tópico y oftálmicas. Obviamente el equipo, el material de vidrio, batas usadas en la preparación de estos productos deben ser estériles.

2.2.1. ESTERILIZACION

La esterilización es el proceso de muerte o remoción de microorganismos y sus esporas viables.

La esterilización puede ser acompañada por procesos químicos, mecánicos y físicos. Los microorganismos son destruidos por el calor. La muerte por calor seco es causado probablemente por deshidratación y subsecuente oxidación de los microorganismos. El calor húmedo puede causar la muerte por desnaturalización y coagulación de proteínas esenciales de la célula. La temperatura letal y el período de tiempo requerido para esterilizar un producto depende del microorganismo, la presencia o ausencia de humedad y las propiedades del producto (48).

La USP indica cinco métodos para la esterilización de productos farmacéuticos.

- 1) Esterilización húmeda (calor húmedo).
- 2) Esterilización por vapor (calor seco).
- 3) Esterilización por filtración.
- 4) Esterilización por gas.
- 5) Esterilización por radiaciones ionizantes.

DESPIROGENIZACIÓN.

El método a usar de esterilización en una preparación farmacéutica es determinada por la naturaleza de la preparación y sus ingredientes (33).

2.2.1.1. CALOR SECO

La aplicación de calor seco convencional (hornos por conducción o radiación) ha sido el método de elección para despirogenizar materiales resistentes al calor. El mecanismo de inactivación de las endotoxinas en este caso es incineración.

Los estándares indican condiciones de exposición cuando menos de 250°C mínimo 30 min., no obstante son valores relativos y dependerán circunstancialmente del volumen de carga del horno. Se recomienda no usar temperatura menor de 175°C.

2.2.1.2. CALOR HUMEDO

Debido a la estabilidad térmica de las endotoxinas se encontró que el calor húmedo no es efectivo para despirogenizar; en condiciones normales (121 °C, 15 psi. pH neutro x 20 min); no obstante, la acción de ciertos agentes despirogenizantes (peróxido de hidrógeno, carbón activado, etc) mejoran su efectividad cuando las soluciones a despirogenizar se introducen al autoclave (14).

2.2.2. DILUCION

Se basa en el lavado o enjuague de materiales (tales como material de cristalería) hasta que la endotoxina esté suficientemente diluida hasta obtener material no pirogénico (32).

Es el método más antiguo y simple para remover endotoxinas de superficies sólidas; simplemente se enjuagan con un solvente no-pirogénico, normalmente agua esteril U.S.P., para inyección. Es un método efectivo cuando se aplica a materiales con bajos niveles de contaminación.

2.2.3. ATRACCION Y MODIFICACION DE CARGA

Se basa en el siguiente mecanismo y utilizando filtros de asbesto:

A pH superior de 2, la endotoxina tiene carga negativa y funciona como aniones. Como tales, se pueden remover por absorción con absorbentes cargados cationicamente tales como asbestos, los cuales tienen una carga positiva en su superficie a pH menores de 8.3.

2.2.4. ATRACCION HIDROFOBICA A UN MEDIO HIDROFOBICO

Los polímeros alifáticos (como propileno, polietileno, politetrafluoroetileno) tienen una afinidad específica única para enlazar endotoxinas, la interacción hidrofóbica entre la membrana polimérica y la región del lípido A es probablemente la responsable de la absorción del LPS.

Robinson (1985) indica que una membrana de polipropileno de 0.1 micrones es capaz de absorber más de 10 microgramos de LPS por centímetro del área de filtro en un amplio rango de pH.

2.2.5. DESTILACION

La destilación es probablemente el método más antiguo para remover pirógenos. Su mecanismo es relativamente simple; el agua cambia de fase dos veces de líquido a vapor a líquido. Durante la primera fase, un rápido calentamiento en el destilador origina que el agua evapore, de modo que el sistema agua-vapor activa el mecanismo de separación. Ya que los pirógenos son moléculas relativamente grandes no pueden moverse tan rápidamente como la interfase agua-vapor, de modo que son

DESPIROGENIZACIÓN.

hechados a un lado por la inercia; y permanecen en las gotas acarreadas por el vapor (32).

Los contaminantes remanentes en el líquido original se eliminan.

Como ventajas presenta una eliminación de todo tipo de contaminantes, es de uso continuo y es de un costo único inicial.

Como desventajas presentes tiene que algunos contaminantes pueden ser arrastrados en el condensado y requiere un mantenimiento cuidadoso para mantener la pureza (35, 44).

2.2.6. SEPHADEX-LAL

El lisado de amebocito limulus (LAL) contiene diferentes proteínas y coágulos en la presencia de cantidades mínimas de endotoxina ya que contiene factor estimulante de colonias que pueden remover virtualmente todo el pirógeno.

El LAL puede acoplarse a glóbulos del sephadex y usarse como una columna de afinidad para endotoxinas.

2.2.7. ALQUILACION

Un estudio publicado por Tsuji y Harrison demuestra que la endotoxina de E. coli 0127:B8 redujo su actividad en un 94% después de que fue esterilizada por óxido de etileno al 12% y Freon 88% con 50% de humedad relativa y 3.5 psig por 6.5 hrs.

Este método es aplicable a sustancias termoresistentes y accesorios quirúrgicos; comunmente se usa óxido de etileno, anhídrido acético, anhídrido ftálico, etc.

Estas técnicas y algunas otras no tan usuales son utilizadas extensivamente en la industria farmacéutica, con el fin de eliminar residuos contaminantes de las soluciones y así garantizar su inocuidad (32).

2.2.8. RADIACIONES Y ONDAS ULTRASONICAS

Las vibraciones ultrasónicas destruyen los pirógenos en la medida en que aumentan su frecuencia, intensidad y duración.

Utilizando radiaciones gamma se necesitan mayores dosis para inactivar pirógenos que para destruir microorganismos en forma vegetativa y esporulada, hongos y virus. Se ha encontrado que las radiaciones afectan ciertos compuestos y se forman peróxidos en el medio irradiado por lo que el uso de esta técnica es poco recomendable (44, 32).

DESPIROGENIZACIÓN.

La radiación directa de rayos ultravioleta de 2600 Å es letal para los microorganismos en el aire y en superficies de exposición, sin embargo, no penetra muchas sustancias y es menos útil en la esterilización de drogas, alimentos y fábricas. La radiación U.V., es útil en la reducción del número de microorganismos del aire. En las áreas de producción de inyectables el uso de lámparas ultravioleta en conjunción de técnicas asépticas son consideradas como prácticas de buena manufactura. Las radiaciones ionizantes como: beta, gama y rayos X pueden ser usadas para matar microorganismos.

Con muy altas energías de radiación el núcleo de la molécula es atacado, resultando en la formación de radicales libres, así los constituyentes celulares son degradados a nivel molecular y después de un tiempo los microorganismos son destruidos (51).

CAPITULO III. ENSAYO DE LIMULUS

Como se había mencionado, el nivel de endotoxinas nos indican las medidas de higiene que se tienen en la manufactura de los productos parenterales. Las endotoxinas son detectadas por una reacción de precipitación que fue descubierta fortuitamente y que ocurre entre las cantidades de endotoxina y el lisado de los amebocitos del *Límulus* (*Límulus Amebocyte Lysate*, LAL). Después de una década se ha desarrollado y la prueba es exacta, precisa y con una muy buena sensibilidad. Esta prueba es una medida directa de la calidad del producto (40). Sin embargo no puede detectar material pirógeno de hongos y otros orígenes (36).

El ensayo de *Límulus* (LAL-Lisado de amebocitos de *Límulus*), es un método muy sensible para la detección de endotoxinas bacterianas. La prueba consiste en combinar la muestra problema con el lisado de amebocitos, incubando a 37°C; se presenta coagulación sanguínea en el *Límulus polyphemus* (cangrejo herradura), debido a la presencia de bacterias.

El Dr. Frederick Bang en 1966, fue el primero en realizar trabajos sobre LAL, descubriendo que las células sanguíneas del cangrejo sufrían coagulación al ser inyectadas con bacterias Gram negativas; con la posterior muerte del animal debida a la coagulación más que a la infección. Continuando con sus estudios, separó las células sanguíneas del plasma y las mezcló con bacterias Gram negativas; observó que

ENSAYO DE LÍMULUS.

solamente las células sanguíneas (amebocitos) eran las responsables de la formación de los agregados.

En 1964, Levin y Bang demostraron que la coagulación de la sangre se debía a que la endotoxina activaba el sistema enzimático por medio de la conversión de la proteína coagulable del amebocito a gel.

La prueba de LAL para pirógenos en parenterales fue aplicada primero por Cooper et al.

La prueba de LAL se estableció como más sensitiva que la prueba de conejo en el ensayo de productos de drogas radioactivas.

Mallinkrodt, Inc; estableció el primero ensayo a larga escala en Chin Coteague, Virginia en 1971 (52).

En enero 12 de 1973 (Registro Federal 38:1404), la FDA estableció que el ensayo de LAL como producto biológico está sujeto a licencia bajo la sección 351 de el Public Health Service Act.

ENSAYO DE LÍMULUS.

Las especificaciones concernientes a la pureza y potencia de LAL fueron propuestas por la FDA Bureau of Biologics en Septiembre 18 de 1973.

También en 1973, Solum realizó con éxito la purificación del coagulógeno del lisado de *Limulus*, reportando un peso molecular de 23100 ± 900 umas. El coagulógeno es la proteína que participa en la formación de gel inducido por bacterias Gram negativas.

Finalmente la FDA anunció las condiciones bajo las cuales el ensayo de LAL pudiera usarse como prueba de productos finales para productos biológicos y de servicio médico; esto fue en noviembre de 1977 (1).

Las especificaciones requeridas por la FDA antes de comprar un lote de LAL está resumido a continuación:

1. Uso de endotoxina estándar de los Estados Unidos para determinar la sensibilidad de LAL.
2. Uso de LAL de referencia de Estados Unidos para establecer la potencia de LAL.

ENSAYO DE LÍMULUS.

3. Cálculo de la potencia de cada lote de LAL y de LAL de referencia usando la endotoxina estándar de Estados Unidos.
 - a) Ensayo de un mínimo de 20 y un máximo de 28 viales.
 - b) El 99% decomisado sobre el límite de una desviación estándar de el logaritmo del radio de referencia y prueba de lisados para 20 viales puede no exceder de 0.73.

4. Requerimientos generales.
 - a) El cangrejo al tomarse la muestra de sangre debe ser manipulado de forma que pueda ser reincorporado a su ambiente natural después de la toma de sangre.
 - b) La prueba de esterilidad debe realizarse en todo el volumen del lote y en cada empaste.
 - c) Correr un control negativo de lisado.
 - d) Prueba para humedad residual.

5. Requerimientos variados de etiquetado.

6. Número apropiado de muestras (no menos de 28 viales) y la documentación de manufactura de cada empaque, datos de la prueba y resultados de todos los ensayos pueden ser presentados para el director de FDA.

La prueba de pirógenos en conejo USP tiene algunas limitaciones las cuales establecen la oportunidad para que la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* se utilice como una posible alternativa (41).

DESCRIPCION DE LA ESPECIE LIMULUS POLYPHEMUS

El *Limulus polyphemus* (cangrejo herradura), es un animal marino, perteneciente al phylum Arthropodo, subphulum Chelicerata, clase Merostomata y subclase Xiphosurs. Los cangrejos herradura son fósiles vivientes de aproximadamente 300 millones de años y tienen como parientes más cercanos a la familia de las arañas.

Los grandes ejemplares de esta especie se establecen en la costa noroeste del océano Atlántico y en el Golfo de México. Otros miembros de este grupo se encuentran a lo largo de la costa asiática en Japón, Corea, India Oriental y Filipinas. Habitan en agua poco profunda, se mueven por medio de desplazamientos cortos sobre la superficie de arena. El *Limulus* es un animal que se alimenta de carroña, consume moluscos, lombrices y otros organismos incluyendo algas marinas.

El cangrejo herradura es de color café oscuro, con un caparazón rugoso, tiene la forma de una herradura, convexo en la parte superior y cóncavo en la inferior. Su cuerpo se divide en cefalotórax y abdomen; se caracteriza por 5 ó 6 pares de

ENSAYO DE LÍMULUS.

apéndices abdominales y por un telson al final del cuerpo. No tiene antenas y el primer par de apéndices preorales se llaman quelíceros.

En el cefalotórax tiene cinco pares de patas que utiliza para caminar, las primeras cuatro patas en su parte superior presentan espinas, su función es macerar y mover la comida hacia la boca, su parte inferior tiene una terminal en forma de pinza. El último par de patas no presenta espinas en su parte superior, sino que presenta un conjunto espatulado que utiliza para limpiar las branquias.

Un último par de apéndices encontrado en el cefalotórax recibe el nombre de quilaria y consiste en una sola articulación armada de pelos y espinas y su función es probable que consista en macerar y mover la comida. Su abdomen no es segmentado, presenta seis espinas cortas de cada lado, encontrada en el borde de la parte posterior, estas espinas tienen movilidad. En su parte inferior muestra seis pares de apéndices. El primer par forma el opérculo genital, es una estructura larga, membranosa, semejante a un ala; los dos poros genitales se localizan en la parte baja de esta estructura.

Posteriores al opérculo genital se encuentran cinco pares de apéndices modificados como branquias, son membranosos y con forma de ala. La parte inferior de cada una de estas estructuras está formada por muchos dobleces con forma de hoja llamados

ENSAYO DE LÍMULUS.

laminillas, estas proveen la superficie de intercambio gaseoso. Cada branquia contiene aproximadamente 150 laminillas, el movimiento de las branquias mantiene una circulación constante de agua sobre ellas.

El telson se encuentra en la parte posterior del abdomen, no es un telson real ya que no presenta el poro anal, es muy móvil y puede ser usado para impulsar y colocar correctamente el cuerpo cuando el animal accidentalmente se voltea. El animal no lo utiliza como mecanismo de defensa, por lo que el *Limulus* puede ser capturado y transportado utilizando el telson.

Las hembras son muchos más largas que los machos. Al iniciar el verano, durante el apareamiento y la postura, hembras y machos se congregan en las zonas alrededor de las costas en bahías y estuarios; las hembras cavan una serie de depresiones en la arena y depositan de 200 a 300 huevos. Los huevos en cada depresión son fertilizados por el macho durante su deposición. Después los animales apareados se separan y los huevos se cubren de arena y son abandonados. Transcurrido un tiempo emerge del huevo una larva de aproximadamente 1 cm., de largo que tiene una similitud superficial con los tribobites, un artrópodo fósil, es muy activa nadando y cavando en la arena, el telson es muy pequeño y solo tiene dos pares de branquias, al pasar el tiempo sufre varias transformaciones, aparecen los pares de branquias faltantes, el telson se alarga y el cangrejo joven asume la forma adulta. Su madurez sexual se alcanza al tercer año de vida (3, 4,5).

ENSAYO DE LÍMULUS.

La sangre de *Limulus* contiene un sólo tipo celular, el amebocito; los amebocitos tienen aproximadamente las medidas de un macrófago de mamífero y presentan gránulos, se ha descrito que poseen un núcleo, el cual no es aparente hasta que los gránulos se desbaratan y desaparecen durante la coagulación. El amebocito tiene un papel muy importante en la coagulación, cuando se extrae sangre completa del *Limulus*, se forman rápidamente conglomerados compuestos de amebocitos agregados, posteriormente este agregado disminuye y aparece una fase líquida. Este material es llamado pre-gel y produce gelificación cuando se expone a las endotoxinas bacterianas, debido a que el cangrejo herradura posee un sistema primitivo de gelificación sanguíneo como mecanismo de defensa.

El plasma del animal libre de células no es coagulable, pero esta propiedad le puede ser conferida por la adición de amebocitos. El lisado celular preparado de amebocitos produce un gel en presencia de endotoxinas lo que indica que la proteína que coagula proviene totalmente de los amebocitos. La cinética de la reacción entre el lisado de amebocitos y la endotoxina se estudió midiendo los cambios en la densidad óptica; los resultados indican que la conversión de la proteína en un gel en presencia de endotoxinas es mediado por una enzima que se designa como pro-coagulante (7, 8). La especificada por la endotoxina a concentraciones relevantes para la pirogenicidad, como activador de la enzima pro-coagulante de los amebocitos, fue descubierto por Yin y otros investigadores.

LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS (LAL)

Un análisis realizado al lisado de *Limulus* indica que existen cuatro sustancias que permiten que se lleve a cabo la reacción de coagulación; estas son; la enzima procoagulante, cuya fracción posee un peso molecular alto, sensible al calor; las proteínas coagulables (coagulógenos), fracciones estables al calor, de bajo peso molecular y por último los cationes divalentes (Ca^{2+}).

Después de que Levin y Bang demostraron que la actividad coagulante del *Limulus* reside en el amebocito, Young y colaboradores establecieron la naturaleza enzimática de la reacción inducida por la endotoxina. Por cromatografía en columnas de sephadex G-50 y G-75 se aislaron 3 fracciones: una de ellas contiene una proteína coagulante con un peso molecular de 27,000 y es termoestable.

La segunda fracción es de un alto peso molecular, es lábil al calor y es activada por la endotoxina y forma un gel con una proteína coagulable. La fracción termolábil fue afectada por un número de enzimas inhibitorias, sugiriendo una actividad basada en los grupos sulfidrilo y serina hidroxilo.

Sullivan y Watson después caracterizaron la enzima coagulante de alto peso molecular. La enzima purificada fue aislada del lisado activado por la endotoxina usando filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y electroforesis en gel.

ENSAYO DE LÍMULUS.

Otros estudios por Tai y Liu demostraron que la activación del zimógeno de la enzima coagulante (enzima procoagulante) depende no solo de la endotoxina sino de la presencia de Ca^{2+} .

MECANISMO DE REACCION

El mecanismo para la reacción implica la activación de la enzima procoagulante por Ca^{2+} y endotoxina. Esta enzima activada acelera el desdoblamiento del coagulógeno en subunidades de polipeptidos. Se realizaron estudios para determinar la naturaleza química del coagulógeno y de sus subunidades; así, las subunidades de coagulógeno se denominaron cadenas, A, B y C, de las cuales las cadenas A y B están unidas por enlaces disulfuro formando el coágulo. La cadena C liberada de la porción interior de la molécula madre; no está incorporada al coágulo.

En el Límulus, el coagulógeno polipeptido está compuesto por aproximadamente 215 residuos de aminoácidos. Ocurriendo la coagulación después de la división de un péptido de 45 residuos de aminoácidos del grupo carboxílico final de la cadena, para dar un péptido soluble C, y un péptido insoluble de aproximadamente 175 residuos de aminoácidos. El péptido insoluble, llamado coagulina, sufre la polimerización para formar un coágulo estable.

ENSAYO DE LÍMULUS.

El mecanismo por medio del cual se produce la división del coagulógeno por la enzima procoagulante se cree que es similar al de la tripsina, hidrolasa de la serina. El disopropil fluorofosfato y otros inhibidores de la hidrolasa de la serina, inhiben la reacción de la gelificación (10, 12, 13, 14, 15, 16).

MECANISMO DE LA REACCION DE LAL

La elucidación de la reacción que ocurre entre la endotoxina y el LAL fue hecha por vez primera por Liu et al, Takagi et al y Mosesson et al. Combinando los resultados de ellos llegamos a la propuesta de la siguiente reacción:

- 1) Endotoxina o un preparado de lípido A derivado de la endotoxina activa una proenzima del LAL, la cual tiene un peso molecular de 150,000.

- 2) La activación también depende de la presencia de cationes metálicos divalentes tales como: calcio, manganeso o magnesio. Se ha observado que la sensibilidad de el ensayo de LAL para la detección de endotoxinas puede incrementarse de 10 a 30 veces usando un reactivo de LAL conteniendo magnesio a una concentración 50 mM.

ENSAYO DE LÍMULUS.

- 3) La proenzima activada, relacionada a la clase de proteasas serina contiene enzimas tales como trombina, tripsina y factor Xa, subsecuentemente reacciona con una fracción proteica de bajo peso molecular (19,-25,000) contenida también en la sustancia de LAL.
- 4) La fracción de bajo peso molecular, llamado coagulígeno es hidrolizado por la proenzima en una subunidad soluble y una insoluble.

La subunidad insoluble aparece como un coagulo sólido, un precipitado, o una solución turbia, dependiendo de la cantidad de coagulígeno insoluble por producto formado.

Una representación esquemática del mecanismo de reacción de el ensayo LAL se observa en la Figura No. 5.

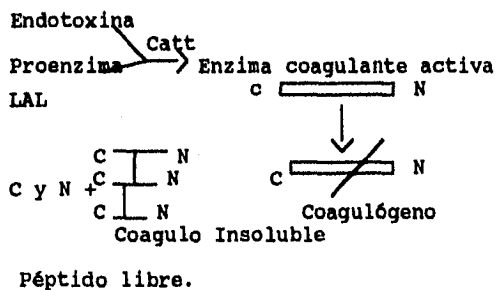


Figura 5. Representación esquemática del mecanismo de reacción de el ensayo LAL. (1)

ENSAYO DE LÍMULUS.

En 1969, J.F. Cooper reconoció la aplicación de LAL en pruebas de pirógenos de productos parenterales, a pesar de que esta prueba "in vitro" inicialmente fue usada como un mecanismo valioso en la investigación de endotoxinas.

PREPARACION DEL LISADO DE AMEBOCITOS

Inicialmente los animales se colocan en agua corriente y a temperatura ambiente unas horas antes de ser sangrados, se manipulan de manera que quede expuesta la membrana entre los segmentos torácicos y abdominal, esta área se limpia con alcohol al 70% (15).

El lisado del amebocito de *Limulus* es preparado colocando al cangrejo en un contenedor especial y se inserta una aguja estéril no pirogénica a través de la bisagra entre la región abdominal y cefalotórax. El hemolinfa puede entonces fluir libremente de la cámara cardíaca a un contenedor apropiado que contenga agente anticoagulante tal como N-etilmaleimida al 0.125% (NEM) en solución de cloruro de sodio al 3%. Estas sustancias sirven para estabilizar la fragilidad membranal del amebocito. Después de la recolección se centrifuga por 10 minutos y el sobrenadante que contiene la hemocianina se descarta. Los amebocitos son lavados 2 ó 3 veces en cloruro de sodio al 3% para remover los químicos anticoagulantes y componentes celulares.

ENSAYO DE LÍMULUS.

Las células se someten a un shock osmótico por adición de agua destilada no pirogénica, así se libera el lisado intracelular.

El producto crudo acuoso es entonces liofilizado y permanece estable a 4°C por un periodo de 3 años (53).

Existen otros métodos para preparar las células (15):

- Método de Reinhold y Fine (1971).- Después de la punción, la sangre de color azul se colecta en frascos de centrifuga siliconizados colocados en un baño a 40°C que contenga volúmenes iguales de solución de cloruro de sodio al 31% adicionada de 0.125% de N-etilmaleimida que debe ser agregada antes de usarse y amortiguador de Tris. El tubo de centrifuga se deja reposar durante 90 minutos con agitación ocasional de manera suave. La mezcla se centrifuga a 300 rpm durante 6 minutos para que los amebocitos sedimenten. Posteriormente se realiza un lavado, el cual consiste en la resuspensión cuidadosa de las células en solución de cloruro de sodio al 13% caliente (40°C) y se centrifugan a 300 rpm durante 6 minutos. Se elimina el fluido sobrenadante y las células se resuspenden nuevamente en la misma solución; esto se repite tres veces.

Al concluir el tercer lavado, las células son transferidas a tubos graduados con tapón de rosca para proceder a lisarlas (16).

ENSAYO DE LÍMULUS.

El medio a utilizar para suspender las células para su lisado puede ser agua destilada o amortiguador Tris que tenga un pH de 7 y que contenga solución salina al 3%. El medio se usa en una porción de una parte del paquete de células y dos partes del medio.

El lisado puede realizarse con ultrasonido, por congelamiento o en un homogeneizador de vidrio.

- Método modificado de Reinhold y Fine por Peter A. Wead y Jeffrey H. Hill (1972) (17). Se sigue el mismo procedimiento anterior, hasta resuspender el paquete celular en agua destilada en una porción equivalente a cinco veces el volumen del mismo, pero inmediatamente se toman alícuotas de 150 ml de la suspensión de amebocitos y se someten a ruptura de las células en un homogeneizador adecuado a una velocidad de 40000 rpm durante cinco minutos; repitiendo el procedimiento. Durante la homogeneización el envase se sumerge continuamente en agua fría. El proceso termina con la ruptura de todas las células.

- Método de Jorgensen y Smith (1973) (17). Se recolecta la sangre en tubos de centrifuga siliconizados conteniendo 100 ml. de solución de N-etilmaleimida al 0.125% y NaCl al 3%, se centrifuga, se elimina el sobrenadante y las células se resuspenden en agua destilada libre de pirógenos y se mantienen a 5°C con

ENSAYO DE LÍMULUS.

agitación. Por último, se centrifuga y se almacena a 5°C o se puede liofilizar y congelar.

Después de añadir el medio, los amebocitos pueden ser lisados por varios métodos:

- Mezclador vortex: La suspensión celular se lleva a la máxima velocidad de mezclado durante 1 minutos para que se lleve a cabo apropiadamente la lisis.
- Sonificación: La suspensión se trata de un "Sonifier Cell Disrupter, Melville N.Y", con el pulso máximo de 10 unidades por 2 ó 3 segundos.
- Lisis osmótica: Los amebocitos lavados se suspenden en agua destilada.

Todos los lisados celulares se llevan a cabo a -70°C. Una vez obtenido el lisado, se lleva a 4°C durante 24 horas, después de este período, el lisado se centrifuga a 900 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante es removido y guardado a -20°C, ya que es sensible al calor; por lo tanto, para su estabilidad se requiere refrigeración, congelamiento o liofilización.

El reactivo de LAL es extremadamente sensible al calor y cuando está en estado liofilizado puede almacenarse en el refrigerador.

ENSAYO DE LÍMULUS.

Bajo reconstitución LAL tiene un promedio de vida de unos meses almacenados en condiciones de refrigeración (29).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Para llevar a cabo la prueba de Endotoxinas Bacterianas descrita en la USP XXII se sigue el siguiente procedimiento:

- a) Reconstituir el liofilizado de lisado de amebocitos de *Limulus*, añadiendo asepticamente 1.2 ml. de agua estéril para inyección U.S.P. al vial del lisado de amebocitos de *limulus* para 10 pruebas.

Mezclar suavemente durante 30 segundos. No agitar fuertemente, ya que se formará espuma en el vial.

- b) Una vez reconstituido el lisado, pipetear cantidades de 0.1 ml. en tubos de ensayo de 10 x 75 mm. con tapón de rosca y tapar los tubos inmediatamente.
- c) Si no se utiliza inmediatamente la solución, congelar el *Limulus* reconstituido a -10°C si se va a conservar por más de un día. El *limulus* reconstituido puede mantenerse congelado hasta cuatro semanas.

PREPARACION DE LA MUESTRA

Ajustar el valor de pH de la solución por analizar a un valor dentro del intervalo 6.0 - 7.5, usando soluciones estériles libres de pirógenos, de hidróxido de sodio 0.1 N o ácido clorhídrico 0.1 N. No se debe ajustar el valor de pH de la solución salina, buffers, ni muestras de agua.

Se toman 5 ml. de muestra a evaluar y se colocan en un vaso de precipitados, por medio de un potenciómetro se mide el valor de pH de la muestra. Si la lectura del potenciómetro nos indica que la muestra a analizar no cumple con el pH requerido, se procede a hacer el ajuste del mismo, adicionando hidróxido de sodio o ácido clorhídrico 0.1 N hasta alcanzar el pH requerido (Este ajuste debe llevarse a cabo en condiciones asépticas).

Una vez que se ajustó el valor de pH, se anotan los mililitros que fueron adicionados en la determinación del ajuste, de tal forma que por medio de cálculos se determinará que cantidad de ácido o base es necesario adicionar al resto de la muestra a evaluar.

Para preparar el control positivo, se reconstituye la endotoxina de E. coli y se prepara una serie de diluciones con agua utilizando la tabla "Diluciones de la Endotoxina".

ENSAYO DE LÍMULUS.

- b) el uso de la solución de la endotoxina a una concentración de 0.05 ng/ml como control positivo asegurará la potencia del producto a la hora en que se efectúe la prueba.

- c) La serie de diluciones debe prepararse de nuevo cada que se van a efectuar las pruebas correspondientes.

Adicionar la muestra y los controles positivo y negativo del lisado; para este paso es necesario primeramente identificar cuatro tubos que contengan reactivo de lisado de amebocitos de limulus de la siguiente manera:

Tubo 1. Muestra original.

Tubo 2.....Muestra duplicado.

Tubo 3.....Control positivo de E. coli.

Tubo 4.....Control negativo.

Una vez identificados los tubos, se colocan en un baño a temperatura de 37°C, se adiciona una alícuota de 0.1 ml. de muestra a ensayar, así como 0.1 ml de solución estándar de endotoxina de E. coli a una concentración de 0.05 ng/ml y 0.1 ml de agua para inyección estéril y libre de pirógenos (la cuál se va a considerar como control negativo de la prueba), a cada uno de los tubos que previamente contienen

ENSAYO DE LÍMULUS.

0.1 ml. de lisado de amebocitos de *Límilus*. Todas las soluciones a probar se deben de calentar en el baño María a 37°C.

Terminadas las adiciones, se mezclan suavemente cada uno de los tubos, evitando la formación de burbujas, posteriormente se ponen los tubos a incubar en el baño a 37°C durante 60 minutos.

Los resultados pueden ser positivos o negativos, no hay términos medios. Un resultado positivo se define como la formación de un gel firme capaz de mantener su integridad cuando el tubo se invierte en un ángulo de 180°, un resultado tal indica la presencia de endotoxina en cantidad suficiente para mostrar una respuesta febril si el producto se inyecta a un paciente.

Una respuesta negativa se caracteriza por la ausencia total de un gel o por la formación de un gel viscoso que no mantiene su integridad cuando se gira en un ángulo de 180°. Esto debe comprenderse, ya que las concentraciones de endotoxina menores a las del umbral del nivel pirogénico pueden causar floculación, granulación y/o un incremento en la viscosidad. Tales reacciones sin embargo se consideran negativas en cuanto a la pirogenicidad.

Determinación de la prueba de compatibilidad:

ENSAYO DE LÍMULUS.

Para llevar a cabo la prueba de compatibilidad de una muestra a probar, se debe determinar si dicho producto causa inhibición, para lo cual, se deben precalentar 150 ml. de agua estéril para inyección U.S.P. a 37°C.

Reconstituir la endotoxina de E. coli añadiendo asépticamente 5.0 ml. de agua estéril para inyección precalentada, al vial que contiene el liofilizado de E. coli. Agitar vigorosamente por aproximadamente 30 minutos para mezclar completamente la solución de la endotoxina. Etiquetar esta solución como "Solución Stock de Endotoxina". La concentración de esta solución stock es de 500 mcg/ml.

Las diluciones subsecuentes de la endotoxina de E. coli se hacen utilizando agua estéril para inyección U.S.P. como diluyente en una serie; en otra serie se utiliza el producto a ensayar como diluyente. Mezclar vigorosamente cada solución por 60 segundos antes de hacer las diluciones subsecuentes. Deben utilizarse tubos despirogenizados de 15 x 150 mm con tapa de rosca. Para hacer estas diluciones se recomienda no exceder un factor de dilución de 10 veces en cualquiera de las diluciones.

Analizar las concentraciones de 0.1, 0.05, 0.025, 0.012 y 0.006 ng/ml. más una muestra del producto libre de endotoxina como sigue:

ENSAYO DE LÍMULUS.

- a) Añadir asepticamente 0.1 ml. de cada una de las cinco concentraciones de cada serie, a los tubos del reactivo de lisado de amebocitos de *Limulus*.

Después de cada adición, deben girarse suavemente los tubos para mezclar el contenido, posteriormente poner los tubos a incubar a 37°C en un baño maría. Poner también una muestra de 0.1 ml del producto libre de endotoxina a los tubos del lisado de amebocitos de *Limulus*.

- b) Dejar incubar todos los tubos por 60 minutos +/- 1 minuto, luego sacar cada tubo cuidadosamente, e invertirlo suavemente. Anotar los resultados obtenidos, la concentración más baja de cada serie la cual de un resultado positivo se le llama punto final.

Concentración de Endotoxina reconstituida = 500 mcg/ml.

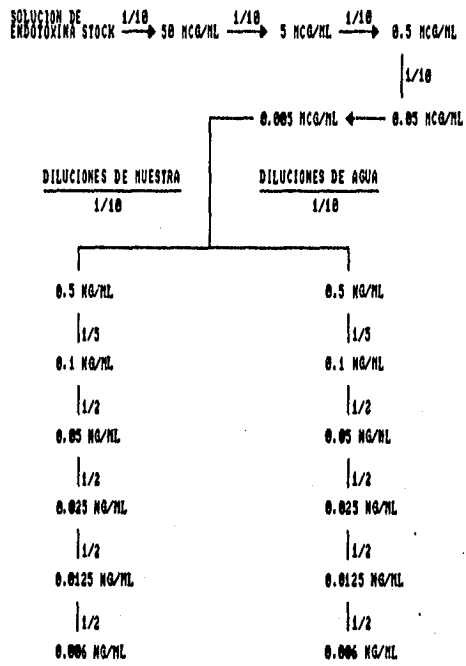
potencia = 10 UE/ng

Por lo tanto: 1 ml de endotoxina reconstituida = 5.0×10^6 UE.

La concentración más baja de cada serie de diluciones la cual de un resultado positivo, se llama punto final.

Una reacción medible puede ser obtenida con poco más de 10 a 20 pirogramos/ml. de lipopolisacárido (un pirogramo es 10^{-12} g ó 10^{-6} µg).

ENSAYO DE LÍMULUS.



ENSAYO DE LÍMULUS.

El ensayo de LAL puede ser utilizado para detectar la presencia de cantidades pequeñas de endotoxina en suero, fluido cerebro espinal, agua para tomar y fluidos utilizados para inyectar (11).

MÉTODOS DE LECTURA DE LA PRUEBA DE LAL

- Inversión del tubo a 180°C: La mezcla endotoxina - LAL es incubada a 37°C por una hora, posteriormente el tubo se invierte y se considera positiva la prueba cuando se forma un gel firme (18). Esta prueba se puede hacer semicuantitativa usando diferentes concentraciones de endotoxina estándar, donde la dilución más alta en la que se forma el gel es la que determina la concentración del problema.

Concentración del problema = $\frac{\text{Concentración del estándar} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Factor de dilución}}$

Si bien el ensayo en gel sólido es el más utilizado en la prueba de LAL, su desventaja es de que tiene un "punto final temprano". Por esto si este método es usado, la endotoxina no puede cuantificarse bajo el nivel al cual un coágulo sólido es formado.

Por otro lado el ensayo turbidimétrico de LAL es más cuantitativo para medir endotoxina sobre un rango de concentraciones.

ENSAYO DE LÍMULUS.

- Lectura turbidimétrica: Este ensayo es predictivo en el aspecto de que cualquier incremento en la concentración de endotoxina causa un incremento proporcional en la turbidez debido a la precipitación de la proteína coagulable (coagelógeno) en el lisado. Así la densidad óptica de diferentes diluciones de la sustancia a probar son leídas contra una curva estándar obtenida usando muestras de la sustancia de prueba contra cantidades conocidas de endotoxina (53).

Esta prueba se basa en el hecho de que un incremento en la concentración de endotoxina causa un incremento proporcional en la turbidez, debido a la precipitación de la proteína coagulable en el lisado. Se corre una curva estándar de endotoxina, y los resultados obtenidos deben ser lineales; donde todas las concentraciones usadas deben estar en un intervalo de 1 a 200 pg/ml. La mezcla se lee a 360 nm con una celda de un centímetro. Un problema de este método, es que la variabilidad de lote a lote, se incrementa cuando el punto final se amplifica espectrofotométricamente (17).

- Método Nefelométrico: Por medio de este método, se cuantifica la concentración de proteína por la dispersión de la luz relativa y es más sensible y seguro que el método espectrofotométrico en el cual la concentración de endotoxina se lee por densidad óptica. Es un procedimiento rápido y muy sensible ya que solamente se

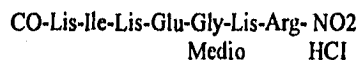
ENSAYO DE LÍMULUS.

requiere de 50µl de lisado. Se puede detectar hasta picogramos de endotoxina, presentando un coeficiente de variación de 8.6% a una concentración de 50 pg de endotoxina lml.

- Prueba en placa: Frauch (1974) fue el primero en sugerir una prueba simple en placa, usando una pipeta capilar. Se mezclan 10µl del lisado con igual volumen de muestra y esta preparación se deja reposar a 37°C durante 30 minutos. Al mismo tiempo, se corre un control positivo y un control negativo. Las muestras se preparan en placas con fondo negro y son fácilmente identificadas por la diferencia de viscosidad y turbidez (19).

Goto y Nakamura (1979) desarrollaron la prueba en placa con 20µl del lisado. El lisado y las muestras se mezclan en una placa de vidrio siliconizado que se cubre y se deja reposar a 37°C durante 30 minutos; cuando la mezcla se seca, forma una configuración característica (19).

- Sustrato cromogénico: Algunos investigadores japoneses iniciaron estudios de detección de pirógenos por método de LAL, desarrollando un método de lectura denominado sustrato cromogénico (19). La estructura del sustrato cromogénico es:



ENSAYO DE LÍMULUS.

El método tiene la ventaja de la especificidad de la endotoxina actividad, que es la enzima pro-coagulable, la cual presenta una actividad de amidasa específica para el grupo carboxitermina y residuos de Gly-Arg. Cuando esta secuencia se conjuga con una sustancia cromogénica como la p-nitro-anilida, esta se libera en proporción directa al incremento en la cantidad de endotoxina. Por otro lado, se puede medir la concentración de endotoxina midiendo la actividad amidasa como la liberación de un cromóforo. El sustrato cromogénico se mide por absorbancia a 405nm. La prueba se realiza con 50µl del lisado. La relación cuantitativa entre el logaritmo de la concentración de endotoxina y la actividad amidasa puede observarse entre 1.5×10^{-6} y 5×10^{-2} µg de endotoxina lml (19). Este método puede realizarse en un tiempo de 60 min.

- Método colorimétrico-de Lowry. Este método ofrece todas las ventajas de una prueba cuantitativa para la endotoxina. Al igual que el método turbidimétrico, se basa en la observación de que las concentraciones de endotoxina que se van incrementando pueden precipitar proporcionalmente incrementando cantidades de lisado de proteínas. Así la cantidad de lisado de la proteína específica (coagulígeno) que es precipitada puede cuantificarse por la determinación de una muestra proteica por Lowry (53).

- Prueba de fluorescencia. Yoshiola y colaboradores desarrollaron un procedimiento usando fluorescamina como un demostrador de fluorescencia. La solución reactiva fluorescente es simplemente adicionada al reactivo de LAL y mezclado en células

ENSAYO DE LÍMULUS.

de cuarzo que contienen varias concentraciones de lipopolisacáridos. Después de la mezcla las lecturas se hacen usando un espectrofotómetro de fluorescencia equipado con un accesorio de polarización y un termostato a 37°C. La mezcla de reacción es excitada a 390 nanómetros y la polarización fluorescente es leída a 500nm (53).

CAPITULO IV. ENSAYO IN VIVO EN CONEJOS.

4.1. PRUEBA FARMACOPEICA PARA LA DETECCIÓN DE PIROGENOS

Como se ha mencionado los pirógenos elevan la temperatura corporal en las personas (hipertermia), e incluso dicho aumento puede causar la muerte, por lo que es de suma importancia el tratar de evitar la contaminación de pirógenos en los medicamentos de administración parenteral, así mismo se han desarrollado técnicas para la detección de los mismos, entre ellas se cuenta con la prueba en animales de laboratorio; dicha prueba se incluye en las farmacopeas de distintos países, no siendo la mexicana una excepción (3).

Actualmente, se utiliza la respuesta febril en conejos para detectar la presencia de endotoxinas bacterianas en varias soluciones de administración parenteral.

Para realizar la prueba oficial de pirógenos se requieren conejos como animales de prueba; deben de estar en un régimen uniforme y sin restricciones durante al menos una semana, es decir, con alimentación, temperatura y condiciones adecuadas.

Las características para seleccionar a los animales es la siguiente:

ENSAYO IN VIVO EN CONEJOS.

- a) Solo se aceptan conejos sanos.
- b) Los conejos serán de la raza Nueva Zelanda blancos (raza pura o media raza albina).
- c) De preferencia que las orejas de los conejos sean relativamente largas, para permitir el uso repetitivo de las pruebas.
- d) De preferencia se deben seleccionar de un solo sexo.
- e) Los animales no deben de perder peso durante el periodo de espera (mínimo desde una semana antes).

Se debe verificar su respuesta al estímulo de la inyección, para lo cual, se inyecta a los conejos con solución salina isotónica estéril y libre de pirógenos, se monitorea su temperatura corporal. Aquellos que muestran un incremento no mayor a 0.5°C ., pueden ser utilizados para la prueba y aquellos que muestran un incremento en la temperatura de 0.6°C ., o mayor, se les descansa por 14 días; una vez transcurrido este periodo se les vuelve a someter a la prueba con el blanco negativo.

Con los resultados obtenidos de las pruebas anteriores, aunados a los exámenes médicos y físicos a los que son sometidos, se integra el expediente de cada conejo. Este expediente sirve para determinar si continúan en las pruebas o si son retirados.

4.2. CONDICIONES DEL BIOTERIO

Las condiciones ambientales del bioterio donde son alojados deben ser especiales y mantenerse constantes; por lo que el bioterio debe contar con:

Área de cuarentena: Es el área donde se colocarán en caso de que presenten alguna enfermedad, o en caso de que sean nuevos animales y se estén adaptando al bioterio.

Área de trabajo: Es el área donde se efectuarán las pruebas y debe de contar con campanas especiales para colocar a los animales, así como jaulas especiales donde se colocarán para facilitar la aplicación y toma de las muestras.

Área de mantenimiento: Es el área donde se encontrarán diariamente, aquí se les coloca en jaulas especiales limpias con recipientes especiales para la comida y el agua.

Cuarto de alimento: Como su nombre lo indica, se contará con un cuarto especial (fresco y seco), en donde se colocará el alimento para evitar el que se descomponga.

ENSAYO IN VIVO EN CONEJOS.

Cuarto de equipo y accesorios: En este cuarto se almacenarán jaulas vacías, recipientes vacíos y todos los accesorios y materiales necesarios para mantener limpio el bioterio.

Cuarto de lavado: Aquí se llevará a cabo la limpieza de jaulas y recipientes, así como la limpieza de todo el material utilizado dentro del bioterio.

Todos los accesorios y jaulas serán de acero inoxidable para facilitar su limpieza, evitar que se deterioren con facilidad y además evitar que dañen a los animales.

El acabado de paredes, pisos y techo de todas las áreas, debe ser de tal forma que facilite su limpieza, de preferencia lisos, de material epóxico y con terminados sanitarios.

El aseo en jaulas debe realizarse diario, así como el cambio de agua y alimento, la limpieza se hará con sanitizantes para la desinfección y con abundante agua.

Se debe de mantener al bioterio libre de ruidos que existen a los animales, sea visto que se alteran fácilmente.

Las condiciones ambientales son muy importantes por lo que se manejan condiciones de temperatura y humedad controladas (20°C. a 22°C. y humedad

relativa de 45 a 55%); se controla la iluminación en periodos de luz y oscuridad de 12 horas; se llevan a cabo de 12 a 15 cambios de aire (este aire no es recirculado). De preferencia se debe de trabajar con los animales en horarios fijos, así como su alimentación, esto es porque se ha visto que se acostumbran fácilmente a ser tratados a determinadas horas (1).

Es muy importante el tener estos cuidados y condiciones de tratamiento con los animales de laboratorio, ya que es indispensable para la realización satisfactoria de la prueba de pirógenos.

4.3. PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO

La U.S.P. establece que el ensayo se efectúa sobre tres conejos, inicialmente; aumentando la cantidad, si el ensayo inicial es dudoso.

Una vez despirogenizado todo el material (jeringas, agujas y material de vidrio), los animales de prueba se colocan en soportes de madera o guillotinas.

Los termómetros se deben cubrir con poca vaselina e insertarlos aproximadamente a 8 cm. por vía rectal. Posteriormente se deja a los conejos en reposo para que se

ENSAYO IN VIVO EN CONEJOS.

estabilice la temperatura durante 30-40 minutos mínimo antes de principiar la prueba.

Se toma como temperatura inicial de cada conejo a la lectura registrada a los 40 minutos inmediatos anteriores a la inyección. Solo se usarán los animales cuya temperatura este entre 38.9 y 39.8°C.

Cada animal se inyecta dentro de los 15 minutos, después de que la temperatura inicial haya sido registrada.

El producto que se someterá a prueba se calienta en un baño de agua a temperatura constante por un tiempo adecuado para asegurar que la solución tenga una temperatura de $37 + 2^{\circ}\text{C}$. al tiempo de inyección.

La prueba de pirógenos en conejos está diseñada para productos, los cuales pueden ser tolerados por el conejo en una dosis de 10 ml/Kg. de peso, los cuales se inyectan intravenosamente durante un periodo no mayor de dos minutos.

Al conejo se le aplicará la inyección sobre la oreja en la vena marginal, inmediatamente después de haberla sanitizado (limpiando de preferencia con alcohol al 70%), posteriormente a la inyección y una vez registrada la temperatura inicial, se

ENSAYO IN VIVO EN CONEJOS.

registraran las temperaturas a la hora, hora y media, dos y tres horas después de la misma.

Una vez registradas las cuatro lecturas, se calculará la diferencia entre la temperatura inicial y la temperatura registrada más alta, para obtener la elevación neta de temperatura por animal.

Con la elevación neta de temperatura por conejo, se sumarán las tres diferencias para obtener la elevación total de la muestra. (La suma total de los aumentos de temperatura no debe incluir valores negativos, solo positivos) (3 y 4).

4.4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

A) Para la prueba inicial (en tres conejos) el criterio seguido para la aprobación de la muestra será el siguiente:

La U.S.P., establece que si en dos conejos por lo menos, se han registrado aumentos de temperatura de 0.6°C. o más sobre la temperatura de control, el ensayo debe considerarse positivo.

ENSAYO IN VIVO EN CONEJOS.

Si uno de los conejos probados para un lote de solución muestra un incremento máximo de 0.6°C o más, o si dos conejos muestran una elevación máxima de 0.4°C o más, o si la suma total de las diferencias de temperaturas es de 1.4°C o más, o si uno o más de los tres conejos muestra un descenso de 0.6°C o más a cualesquiera de los tiempos registrados, entonces se considerara una prueba inicial dudosa (repitiéndose en cinco conejos).

B) Para la repetición en ocho conejos (tres conejos iniciales y cinco de repetición), se seguirá el siguiente criterio:

Si no más de tres de los ocho conejos muestran una elevación individual de temperatura de 0.6°C o más, y si la suma de las ocho diferencias de temperatura no excede de 3.7°C , el material bajo prueba se considera libre de pirógenos.

Si la prueba inicial (en tres conejos) y la prueba de repetición (en cinco conejos) falla, la siguiente muestra será probada en ocho conejos, siguiéndose para su interpretación el mismo criterio del párrafo anterior.

Una vez realizada la prueba, el criterio que se sigue para la reelección de los animales que ya han sido probados, será el siguiente:

No se usarán animales en intervalos de tiempo menores de 48 horas a partir del último día que fueron sujetos a prueba.

Si un animal ha sido usado para prueba de pirógenos previas, en la cual su respuesta en temperatura fue de 0.4°C o más, éste no será usado hasta después de un periodo de reposo de un día por cada 0.1°C de incremento en su respuesta.

Cuando la muestra sea catalogada como pirogénica, todos los animales deberán tener un periodo de descanso de dos semanas (3 y 4).

4.5. CONSIDERACIONES SOBRE EL ENSAYO

Charonat y Lechat (2) realizaron importantes consideraciones sobre las condiciones de ensayo de la endotoxina bacteriana en conejos, ellos propusieron:

- a) Los conejos no deben colocarse en aparatos de contención durante las mediciones de temperatura para evitar en enfriamiento debido a la inmovilidad.
- b) La recomendación de colocar el termómetro más allá del esfínter interno no es precisa. La U.S.P. aconseja colocar el termómetro o el aparato registrador a no menos de 7.5 cm. desde el esfínter interno.

c) Para discutir el incremento máximo de temperatura a aceptar, es necesario conocer bien la equivalencia entre la reacción térmica de los conejos y la de los enfermos para una misma solución inyectada, a dosis comparables. Algunos autores encontraron que soluciones apirogénicas en el conejo, también lo fueron en el hombre y soluciones poco hipertermizantes para el conejo, no lo fueron para el hombre. Así mismo algunos autores consideran que la inyección de 10 ml/Kg. en el conejo, puede ser insuficiente para controlar soluciones que se administran en gran volumen y excesiva para las que se administran en poco volumen.

Otros autores llegaron a conclusiones similares, entre ellos destacan los ensayos realizados por Tennet y Ott (5), de los cuales, se llegó a las siguientes observaciones:

Algunos conejos que inicialmente mostraban respuestas aceptadas como positivas por la farmacopea (incrementos de temperatura de 0.6° a 0.9°), después con igual dosis, dieron la prueba negativa. Por lo que se puede cometer el error de aceptar una solución como apirogénica cuando en realidad lo es.

Resulta difícil establecer la relación que hay entre la dosis y el desarrollo de la tolerancia mostrada en algunos conejos; tanto dosis grandes como pequeñas pueden inducir la tolerancia.

CAPITULO V. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

5.1.COMPATIBILIDAD DE LOS MÉTODOS

Por muchos años, solo se detectaron pirógenos por el aumento de la temperatura en los conejos de prueba, pero este método tiene desventajas inherentes, ya que cada producto se prueba, con 3 a 8 conejos, obteniéndose solo así resultados válidos (14).

El empleo de conejos en la prueba, hace que ésta resulte costosa ya que los animales requieren para su cuidado, personal capacitado además de un sitio adecuado para realizar la prueba en donde no influyan las condiciones ambientales en los resultados (9).

Antes de realizar la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* en el producto, es necesario establecer que la solución a ser probada no interfiere con la formación del gel. Por lo cual debe ensayarse una serie de diluciones de la endotoxina de *E. coli* en el producto para establecer que un gel firme se obtenga con concentraciones de *E. coli* en el intervalo de 0.01 a 0.05 ng/ml. Esto establecerá que el producto no afecta la sensibilidad al reactivo de lisado de amebocitos de *Limulus*.

Mills (7), realizó un estudio exhaustivo de correlación entre la prueba de pirógenos USP (8 conejos/dosis) y la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus*. La tabla

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

siguiente compara la dosis umbral de endotoxina en el conejo capaz de dar respuesta febril con el tiempo de gelificación correspondiente (prueba de lisado de amebocitos de *Limulus*).

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

TABLA 2.
MÍNIMAS DOSIS PIROGÉNICA (CONEJOS) CONTRA
EL TIEMPO DE GELIFICACIÓN (LAL)

ENDOTOXINA	CONEJOS MÍNIMA DOSIS PIROGÉNICA (MDP ₅₀) (ug/ml/kg)	TIEMPO DE GELIFICACIÓN PARA MPD ₅₀ CONCENTRACIÓN EN ng/ml
<u>E. coli</u>	0.55	20
<u>K. pneumoniae</u> (Referencia FDA)	3.50	37
<u>Serratia</u> <u>marcescens</u>	1.40	30
<u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u>	0.74	25
<u>Salmonella</u> <u>minnesota</u>	1.40	25
<u>Salmonella</u> <u>enteritidis</u>	1.60	25
<u>Salmonella</u> <u>abortus equi</u>	1.35	30
<u>Shigella</u> <u>flexneri</u>	0.90	20

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

Se aprecia en la tabla que mientras las MPD₅₀ para las diferentes endotoxinas puede variar considerablemente, el tiempo de gelificación de las pruebas de lisado de amebocitos de *Limulus* mantiene un paralelismo íntimo con la respuesta biológica en los conejos.

El tiempo de gelificación se define como el tiempo de incubación en minutos a 37°C., necesario para que forme un gel firme de una mezcla del *Limulus* y suspensión de endotoxina a partes iguales.

Se entiende por gel firme un gel capaz de mantener su integridad en el tubo de ensayo en posición invertida.

MPD₅₀ Es la concentración mínima de endotoxina que causa una elevación de 0,6°C en la temperatura del 50% de los conejos experimentados a una dosis de 1.0 ml/kg de peso.

Algunos resultados de la compatibilidad de la prueba de lisado de amebocitos de *limulus*, realizados por Mills, en la empresa Mallinckrodt, se presentan a continuación.

En esta tabla se muestran los productos compatibles con la prueba de lisado de amebocitos de *limulus*, analizados por Mills en Mallinckrodt Inc (8).

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

PRODUCTO	POTENCIA	DILUCION
Dihidroestreptomicina	460 mg/20 ml	Sin diluir
Digoxina	0.1 mg/ml	1:8
Tartrato de Ergostamina	0.05%	1:4
Epinefrina	5 mg/ml	1:4
Heparina	1000 U/ml	Sulfato de protamina o polibreno
Emulstones de Lípidos	5% y 10%	Pyrosperre TM
Mesoridazina	2.5%	1:128
Metamina Clorhidrato	10 mg/ml	1:4
Penicilina G-Potásica	25.3 mg/20 ml	1:2
Penicilina G-Benzatina	100 mg/29.2 ml	Sin diluir
Ascorbato de sodio con preservativo	250 mg/ml	1:8
Ac. Ascórbico sin preservativo	500 mg/ml	1:32
Amplicina Sódica	335 mg/15 ml	1:2
Albúmina	5% y 25%	Pyrosperre Tm
Cloruro de Sodio		
Bacteriostático Iny.	0.9%	1:4
Cluconato de Calcio	100 mg/ml	1:2
Betametazona	6 mg/ml	1:50
Carbencilina	2 g/15 ml	1:64
Cloxacilina	1 g/14.5 ml	1:32
Ciclicina Lactato	50 mg/ml	1:8
Pavidona Todada	1%	1:80
Rivoflavina	10 mg/ml	Sin diluir
Cloropromazina	25 mg/ml	1:1024
Cimetidina	150 mg/ml	1:1024

En esta tabla se muestran los productos parenterales de pequeño volumen compatibles con la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus*, analizados por Mills en Mallinckrodt Inc (8).

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

PRODUCTO	POTENCIA	DILUCIÓN	AJUSTE DE PH
Aminofilina	25 mg/ml	Sin diluir	Ajustar
Sulfato de Atropina	0.4 mg/ml	1:25	Ajustar
Mepiridina Clorhidrato	50 mg/ml	1:250	Ajustar
Clorpromacina Clorhidrato	25 mg/ml	1:50	Ajustar
Clorprotireno Clorhidrato	12.5 mg/ml	1:12	Ajustar
Gonadotropina corionica	10,000 U. USP	Sin diluir	Ninguno
Fosfato de Codeína	30 mg/ml	1:25	Ninguno
Corticotropina Iny.	25 U. USP	1:2	Ninguno
Ciclofosfamida	20 mg/ml	Sin diluir	Ninguno
Digoxina Iny.	0.1 mg/ml	1:10	Ninguno
Difenhydramina Clorhidrato	10 mg/ml	Inhibitorio	Ajustar
Doxapram Clorhidrato	20 mg/ml	1:10	Ninguno
Doxiciclina	10 mg/ml	Inhibitorio	Ajustar
Dorpiridol Iny.	1.25 mg/ml	Sin diluir	Ajustar
Difflina Iny	250 mg/ml	1:25	Ajustar
Edetato Disódico Iny.	150 mg/ml	Inhibitorio	Ajustar
Citrato de Fentanil	0.05 mg/ml	Sin diluir	Ninguno
Citrato de Fentanil y Droperidol	0.05 mg/ml 2.5 mg/ml	Sin diluir	Ajustar
Furosemida Iny.	10 mg/ml	1:80	Ninguno
Glicopirolato Iny.	0.2 mg/ml	1:20	Ninguno
Haloperidol Iny.	5 mg/ml	1:25	Ajustar
Inulina solución	5 g/50 ml	Sin diluir	Ninguno
Pentobarbital Sódico	50 mg/ml	1:20	Ajustar
Tetraciclina Clorhidrato	250 mg/1.8 ml	Inhibición	Ajustar
Agua Inyectable	---	Sin diluir	---

En esta tabla se muestran los radioisotopos para diagnostico, compatibles con la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus*, analizados por Mills en Mallinckrodt Inc. (7).

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

PRODUCTO	AJUSTE	DILUCION
Pertecnetato de Sodio para generador (Tc99m)	Adicionar 0.04% de silicato de Sodio de la muestra	Sin diluir
Citrato Ferroso (Fe59)	pH	Sin diluir
Citrato de Galio (Ga67)	pH	1:3
Iodopurato de Sodio (I131)	pH	1:4
Difosfonato de Metileno	pH	Sin diluir
Macro agregado de Albúmina	pH	1:2
Pirofosfato Tc99m	pH	Sin diluir
Fosfato Crómico (P32)	pH	1:5
Metionina de Selenio (Se75)	pH	1:2
Xenon Solución (Xe133)	—	Sin diluir

5.2. COMPARACION DE LOS METODOS

La principal preocupación acerca del lisado de amebocitos de *Limulus* se centra en el nivel de sensibilidad necesario para que éste se muestre equivalente o superior a la prueba de pirógenos con conejos. Cooper y col. (4), fueron los primeros en presentar datos sobre la correlación entre la prueba de *Limulus* y la prueba de pirógenos U.S.P., y ha sido seguido por otros investigadores tales como Noordwijk (8). Se muestra en la siguiente tabla la sensibilidad de la prueba de *Limulus* y la prueba en conejo con cuatro diferentes endotoxinas.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE LÍMULUS Y PRUEBA DE CONEJO PARA PIROGENOS,
CON CUATRO TIPOS DIFERENTES DE ENDOTOXINA

PIROGENOS		REACCIÓN		
ORIGEN	CONCENTRACIÓN mg/ml	LÍMULUS		CONEJO
		1hr.	2hr.	
Endotoxina <i>E. coli</i> (Mallinckrodt)	50	+	+	+
	5	+	+	+
	5 x 10 ⁻¹	+	+	-
	5 x 10 ⁻²	+	+	-
	5 x 10 ⁻³	+/-	+	
	5 x 10 ⁻⁴	-	+/-	
Endotoxina <i>S. marcescens</i> Proposed Internacional Preparación de referencia B	50	+	+	
	5	+	+	
	5 x 10 ⁻¹	+	+	+
	5 x 10 ⁻²	+	+	+
	5 x 10 ⁻³	+/-	+	-
Endotoxina <i>P. vulgaris</i> Proposed Internacional Preparación de referencia A	50	+	+	+
	5	+	+	-
	5 x 10 ⁻¹	+	+	-
	5 x 10 ⁻²	+	+	
	5 x 10 ⁻³	+/-	-	
	5 x 10 ⁻⁴	-	-	
Medio de <i>K. Pneumoniae</i> k67	50	+	+	+
	5	+	+	+
	5 x 10 ⁻¹	+/-	+/-	-

En un estudio de correlación in vitro e in vivo, los resultados de compatibilidad a endotoxina de *E. coli* entre la prueba de pirógenos por conejo y prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* fue el siguiente.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

E. coli * ng/ml	VOL. INYECTADO ml/kg	INCREMENTO TOTAL DE TEMPERATURA °C USP	RESULTADO PRUEBA EN	RESULTADO * LÍMULUS
3.0	1.0	6.0	POSITIVA	POSITIVA
2.0	1.0	4.0	POSITIVA	POSITIVA
1.0	1.0	3.4	POSITIVA	POSITIVA
0.5	1.0	1.5	POSITIVA	POSITIVA
0.25	1.0	1.2	NEGATIVA	POSITIVA
0.125	1.0	1.0	NEGATIVA	POSITIVA
0.06	1.0	0.7	NEGATIVA	POSITIVA
0.03	1.0	0.2	NEGATIVA	POSITIVA

* Estándar de endotoxina de *E. coli* y lisado de amebocitos de *limulus de mallinckrodt*.

Como puede observarse, la concentración de endotoxinas mínima detectable por conejo es de 0.5 ng/ml de peso para la prueba de conejo y para la prueba de lisado de amebocitos de limulus es de 0.03 - 0.06 ng/ml.

La respuesta pirogénica en el conejo es dependiente de la cantidad de pirógeno inyectado por unidad de peso, por lo que la sensibilidad de la prueba es principalmente dependiente de la dosis.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

En contraste, la sensibilidad de la prueba del limulus es esencialmente dependiente de la concentración y del tiempo, debido a que la velocidad de formación del gel opaco (el punto final), es dependiente de la concentración de endotoxina.

Cuando se compara la sensibilidad de las dos pruebas a una concentración específica de pirógenos, en la prueba de conejos, el volumen, y en la prueba de limulus, el tiempo, se deben mantener constantes. El volumen no es una variable en la prueba de limulus ya que está diseñada para un volumen constante, usualmente de 0.1 a 0.2 ml (5).

Existen sustancias como la adrenalina, azul de metileno, anfotericina B, que producen hipertermia y otras como el gluconato de calcio, algunos sedantes, anestésicos, corticosteroides, derivados de la fenotiazina, antipiréticos, etc., que disminuyen la temperatura. Por lo que no es aconsejable el método por reacción térmica en estos productos, pero si el del lisado de amebocitos de Limulus.

En estudios realizados en otros países, se evaluaron las dos técnicas. Los resultados encontrados indicaron que la prueba de LAL no podía reemplazar a la prueba en conejo por lo siguiente:

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

- 1) Esta prueba solamente detecta endotoxinas de bacterias Gram negativas y no de otro tipo de pirógenos (bacterias Gram positivas, levaduras, detergentes y metales pesados), además la sensibilidad no es igual para diferentes endotoxinas (9,10).
- 2) El rango óptimo de pH para que ocurra la reacción con la endotoxina está entre 6.8 y 7.5. Cuando el pH es más bajo de 5.1 y más alto que 9.0, no existe una reacción visible, también puede ser modificada la estructura del principio activo por ejemplo la Tetraciclina a pH 6-8 precipita por lo que la prueba no puede ser leída (9).
- 3) La prueba de LAL puede dar resultados falsos negativos, ya que la presencia de calcio causa reacciones negativas, debido a que este catión es capaz de inhibir la formación del gel.

5.3. DISCUSIÓN SOBRE LAS VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS

Las ventajas de la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* sobre la prueba de pirógenos en conejo, es su alta sensibilidad, bajo costo y su alta reproducibilidad. Actualmente existen diversas técnicas de lisado de amebocitos de *Limulus*, como

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

son la técnica el placas de gel, la turbidimétrica, la cromogénica y la fluorométrica. Dichas técnicas ya han sido aprobadas por la U.S.P (12).

Algunas desventajas en la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* es que se inhibe o se potencia con muchas sustancias tales como antibióticos, hormonas, metales pesados, aminoácidos, alcaloides, carbohidratos, proteínas plasmáticas, enzimas y electrolitos en la solución problema, dándonos resultados falso positivos o falso negativos, por lo que se deben realizar pruebas de compatibilidad del producto con el lisado de amebocitos de *Limulus*.

En diversos laboratorios se están desarrollando técnicas para resolver estos problemas, tales técnicas comprenden desde la ultrafiltración, dilución, calentamiento, diálisis y adición de detergentes así como de endotoxinas específicas para eliminar el factor de coagulación que interfiere.

La prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* no se ha aceptado como una prueba oficial para la detección de pirógenos en producto terminado. Las razones de esto son que la respuesta a diferentes endotoxinas no es la misma, la formación del gel se ve afectado por algunos compuestos como cationes, corticosteroides, lípidos, cloranfenicol, tetraciclina, etc., dando como resultado una prueba negativa, que podría ser un falso negativo. El pH óptimo para que se lleve a cabo la reacción con la endotoxina debe ser 6.8 a 7.5, ya que si el pH es menor de 5.1 o mayor a 9.0 no se

COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

observa la reacción, por lo que algunos principios activos no son compatibles con la prueba de Límulus, ya que su estructura se puede afectar.

El ensayo de Límulus resulta más barato y se puede realizar en poco tiempo, los resultados de la prueba se obtienen en menor tiempo; comparando con el método in vivo éste resulta más costoso y requiere de un tiempo mayor para su realización. En cuanto a la confiabilidad el ensayo in vivo es más confiable siempre y cuando la técnica se realice la forma indicada y cumpliendo con todos los requisitos durante el desarrollo de la misma.

CONCLUSIONES

Las técnicas empleadas para detectar la contaminación con pirógenos de las soluciones que se aplican por vía parenteral, son:

- a) Prueba de pirógenos en conejo.
- b) Prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL).

Las ventajas de la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* son:

1. La prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* proporciona resultados uniformes en el análisis de lote a lote, por lo que se considera altamente reproducible.
2. Las pruebas pueden realizarse en 60 minutos, por lo que es una prueba rápida, así mismo, al ser los tiempos de análisis pequeños, se pueden llevar a cabo varias determinaciones en un solo día.
3. Las necesidades de equipo para llevar a cabo la prueba son mínimas, por lo que se puede capacitar al personal para realizar esta prueba con gran facilidad.

CONCLUSIONES.

4. La prueba de *Limulus* es altamente sensible, ya que logra determinar concentraciones muy bajas de endotoxinas, en el orden de ng/ml, logrando con esto, el que la prueba sea cuantitativa.

Algunas desventajas encontradas para la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus*, son:

Al aplicar esta prueba en sustancias como los antibióticos, hormonas, metales pesados, aminoácidos, alcaloides, carbohidratos, proteínas plasmáticas, enzimas y electrolitos, se ha observado que pueden inhibir la formación del gel, así mismo, también pueden reaccionar con el lisado de amebocitos de *limulus*, formando el gel, obteniendo resultados falsos; por lo que es necesario conocer la naturaleza del producto a probar para determinar si es compatible con el reactivo de lisado de amebocitos de *limulus*.

La prueba in vivo presenta las siguientes ventajas.

1. Se logran detectar pirógenos de bacterias Gram positivas, levaduras, detergentes, metales pesados y partículas, además la sensibilidad es similar para las diferentes endotoxinas.

CONCLUSIONES.

2. Es una prueba aceptada por la Secretaría de Salubridad y por la F.D.A. de los Estados Unidos.
3. El procedimiento es universal, ya que aparece en las principales farmacopeas (Estados Unidos, Europa, Británica, etc.).

Las desventajas encontradas en la prueba de pirógenos por conejo, son:

1. Algunas de las sustancias por su naturaleza de producir hipotermia, no pueden ser probadas.
2. Se requiere de personal altamente capacitado para realizar las pruebas, además de instalaciones específicas.
3. Es muy problemática la obtención de una raza de conejos que permita obtener resultados confiables en México.

La reproducibilidad en algunos casos es muy dudosa, ya que depende de la respuesta fisiológica individual de cada conejo.

No es una prueba cuantitativa ya que solo se observan sus resultados en forma cualitativa (aumento de temperatura en los conejos).

CONCLUSIONES.

Es muy difícil monitorear el proceso de fabricación si se contamina con pirógenos, debido a que la prueba se realiza en un tiempo mínimo de cuatro horas.

Aún con todas estas desventajas, esta prueba da resultados confiables para el análisis del producto terminado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akers J. Michael. Parenteral Quality Control, Marcel Dekker, Nueva York, 1988, p. 79.
2. Ansel, Howard C. Pharmaceutical Dosage forms and Drug Delivery Systems. Lea & Febiger 5ª ed. Philadelphia, 1990, p. 267.
3. Armistead, R.L., and Taylor, N.L. Desing and Operation of an In-House Pyrogen Test Facility. Bull. Parent. Drug. Assoc. Vol. 31, No. 1. Enero/Febrero, 1977. p. 14-17.
4. Armistead, R.L., et. al. Diseño y Operación de Instalacioens para la Pruebas de Pirógenos. Bull. Parent. Drug. Assoc. Vol. 31, No. 1. Enero/Febrero, 1977. p. 14-17.
5. Atlatl, Ronald. M. Microbiology. Fundamentals and Applications. 2a. ed. Mac Millan Publishing Company. New York, 1989. pp. 521-522.
6. Avis, Kenneth E. Fharmaceutical Dosage forms. Parenteral Medications. Vol. II. Marcel Dekker, INC. New York, 1986, pp. 518, 528, 602.

BIBLIOGRAFÍA.

7. Bangham, D.R. The Pyrogen Test Problem. International Symposium on Pyrogens, University College, London, 1975.
8. Barnes, B. Invertebrate Biology 3ª ed. Edit. Saunders N.Y. 452, 1974.
9. Bernheimer A.W., Mechamims in Bacterial Toxicology, Ed. Pub. John Wiley & Sons, Inc. (1976).
10. Brade, L. Brandenburg, K.; Kuhn H; Kasumoto, S. The immunogenicity and Antigenicity of Lipid A are influenced by its Physicochemical state and environment. *Infect. Immun.* 55(11): 2636-2644, 1987.
11. Brock Thomas D. Biology of Microorganismos. 6a. edición, Ed. Prentice-Hall, New Jersey, 1991. p. 62.
12. Burrell, Robert. Toxicology of the Immune System. Van Nostrand Reinhold N. Y. 1992. pp. 161, 297.
13. Cabello, Romero. Microbiología y parasitología humana. 1ª ed. Editorial médica Panamericana. Bogotá 1993. pp. 67.

BIBLIOGRAFÍA.

- 14 Carleton J., Frederick, Yalislacion of a septic pharmaceutical processes, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1986, pp. 481-482.
- 15 Caroff M; Bundle D; Pery M. Structure of the O-Chain of the phenol phase soluble cellular lipopolusaccharide of Yersinia enterocolitica serotype o:9. Eur. J. Biochem, 1984;139; 195-200.
- 16 Carstensen, Thuro J. Theory of pharmaceutical systems. Vol. I. General Principles. Academic Press. New York and London 1980. 148-149.
- 17 Charonat, R.; Lechat, P. Ann. Pharm, Franc. No. 9, 1951 p. 17-22.
- 18 Cross, A.S. Silberry, H. & Sadoff, J.C. The Human Antibody Response During Natural Bacteremic Infection With Gram-Negative Bacili against Lypopolysaccaride Core Determinants. J. Infect. Dis. 160(2): 225-236. 1989.
- 19 Cruz R. Calderón E. Parool celular de bacterias Gram-negativas. Infectología. 1982;11; 675-682.
20. Cooper, J.F., Levin, J. and Wagner, H.N. Quantitative Comparison of In Vivo and In Vitro Methods for the Detection of Endotoxin. J. Lab. Clin. Med. Vol. 78, 1971. p. 138.

BIBLIOGRAFÍA.

21. Cooper, J.F., Pearson, S.M. Detection of Endotoxin in Biological Products by the Limulus Test. Memphis, U.S.A. 1977.
22. Dulbecco Davis. Tratado de Microbiología. Salvat Editores. España. Segunda Edición 838-843.
23. Evans, Alfred S. Bacterial Infections of Humans. 2ª ed. Plenum Medical Book Company New York and London, 1991. pp. 648.
24. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 5a. ed. 1988. pp. 226 y ss.
25. Farmacopea de los Estados Unidos. U.S.P. XXII, 1990. pp. 1493-1495 y 1515-1516.
26. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7a. ed. 1990.
27. Farmacopea de los Estados Unidos. U.S.P. XXIII, 1995.
28. Gaffin, S.L. The clotting of white cells of *Limulus* induced by endotoxin J. Preparation and characterization of clotforming proteins. *Biorheology* 13: 273, 1976.

BIBLIOGRAFÍA.

29. Greisman, S.E., and Hornick, R.B. Comparative Pyrogenic Reactivity of Rabbit and Man to Bacterial Endotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 131, 1969. p. 1154-1158.
30. Groves, Michael J. Parenteral technology manual. 2ª ed. Interpharm Press, Inc, USA, 1989, pp. 119-139.
31. Groves, Michael J. Sterile Pharmaceutical Manufacturing Applications for the 1990's. Vol. II. Interpharm Press, Inc. USA, 1991, pp. 186, 187, 141-143.
32. Hegner and Engemon, Invertebrate Zoology 2ª ed. Edit. Mac Millan N.Y, 447, 1968.
33. Helman, José. Farmacotecnia teórica y práctica. Tomo V, 1ª ed. Editorial Continental, Madrid, España, 1981, cap. 37.
34. Hochstein, H.D. Further developments of Limulus ameobocyte lisate test. Bull Parenteral Drug Assoc, 26: 153, 1973.
35. Howard Ansel. Introduction to pharmaceutical Dosage tormas. 3ª ed. Lea & Febiger. Philadelphia. 1985. pp. 237.

BIBLIOGRAFÍA.

36. Hugo, W.B. *Pharmaceutical Microbiology*. 3^a ed. Blackwell scientific publications. Oxford London 1986. pp. 335,346,405.
37. Iglewski, Barbara H. Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis. Vol. XI, Academic Press, Inc. San Diego, 1990. p. 427.
38. Jawetz I. Melnick J; Adelberg E. *Microbiología Médica Editorial el Manual Moderno*. México, D.F. 1985, 11 edición.
39. Jorgensen, J.H., Carvajal H.L., Chipps BE, Smith R.F., *Applied Microbiology*, American for Microbiology, 26, pp. 38-42, 1993.
40. Klegerman, Melvin. E. *Pharmaceutical Biotechnology. Fundamentals and Essentials*. Interpharm Press, Inc. °992. pp. 231.
41. Lachman, León. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. 2a. edición. LEA, Febiger Phyladelphia, 1980. pp. 588, 621, 622.
42. Lawson, David H. *Clinical Pharmacy*. Chapman and Hall 1985. London, 46, 272, 302.

BIBLIOGRAFÍA.

43. Levin, J. Bang F.B. Clottable protein in Limulus: Its localization and Kinetics. *Thrombo. Daithes Haemorr*, 19: 186, 1968.
44. Levin, J. Bang F.B. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. *Bull. Johs Hopkins Hosp.* 115, 265, 1964.
45. Mac Genirie and Mac Genitie, *Natural History of Marine Animals*, 2^a ed. Ed. Mc Graw Hill, N.Y., 325, 1959.
46. Mills, D. F. Unpublished Correlation Data on Radio-pharmaceuticals and Other Parenterals Pyrogen Test versus USP XVIII Pyrogen Test. Mallinckrodt, St. Louis, Mis. 1974.
47. Morrison, D.C. & Ulevitch, R.J. The effects of bacterial Endotoxins on Host Mediaton Systems. *Am. J. Pathool.* 93(2):527-537. 1978.
48. Murray, Patrick R, *Medical Microbiology. The C.V., Mosby Company, St. Louis*, 1990 pp. 6-7-8.
49. Nakamura, Shin., et. al. A clottable protein. (Coagulogen) of Horseshoe crab hemocuytes structural change of its polypeptide chain during gel formation J. *Biochem* 80: 649, 1976.

BIBLIOGRAFÍA.

50. Noorwijk Van, J. and Jong De Y. Comparison of the Limulus Test for Endotoxin with the Rabbit Test for Pyrogens of the European Pharmacopeia. J. Biol. Standar. Vol. 4, 1976. pp. 137-139.
51. Parrott, Eugene L. Pharmaceutical Technology. Fundamental Pharmaceutics. Burgess Publishing Company. Minneapolis. Minn. 1978. pp. 290.
52. Pearson, F.C., Warg M. Bioscience, 30, No. 7, pp. 461-464, 1980.
53. Pearson, Frederick C. Pyrogens. Endotoxins, LAL Testing and Depyrogenation. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1985.
54. Razinddins S. Toxic and immunological properties of the lipopolysaccharides (o-antigens) from vibrio El - Tor. Immunochemistry. 1978; 15; 611-614.
55. Redmond J. The structure of the O-antigenic side chain of the lipopolysaccharide of V. Cholerae 569B (Inaba). Biochimica et Biophysica Acta. 1979;584; 346-352.
56. Ronneberger, H.J. Comparison of the Pyrogens Test in Rabbits and with Limulus Lysate. Develop. Biol. Standar. Vol. 34, 1977. pp. 27-32.

BIBLIOGRAFÍA.

57. Roitt, Juan M. Encyclopedia of Immunology. Vol. III. Academic Press. London 1992. pp. 559.
58. Roth, James A. Virulence Mechanisms of Bacterial pathogens. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1988. 61, 213, 241.
59. Ruiz Robles, Ruben. Investigación de reacciones cruzadas a Brucella en Sueros de Pacientes con Vibrio Cholerae. FES, Cuautitlan, UNAM, 1993, pp. 33-37.
60. Satoshi, M., Masahiro, N., Taizo, W., Tadashi, S. and Tetsuya, T. Specific Assay for Endotoxin Using Immobilized Histidine and Limulus Amebocyte Lysate. Anal. Biochem. Vol. 198, 1991. pp. 292-297.
61. Salgado Vázquez, Rafael, Instalación y evaluación de los sistemas de agua de una empresa farmacéutica, FES, Cuatitlan, UNAM, 1995.
62. Solum, N.O. Some characteristics of the clottable protein of Limulus polyphemus blood cells. Throm Daith Haemorr, 23: 170, 1970.
63. Solum, N.O. The coagulogen of Limulus polyphemus hemocytes. A comparisen of the clotted and noclo tted forms of the molecule. Throm. Res 2: 55, 1973.

BIBLIOGRAFÍA.

64. Spadoni, Manlio. Peligros de los Medicamentos Editorial Continental. México 1980. pp. 749.
65. Sullivan, J.D. Purification and properties of the clotting enzyme from Limulus lisate. *Biochem and Biophys. Res. Comm*, 66: 848, 1975.
66. Tai, J. Y. Studies on Limulus amebocyte lisate. Isolation of pro-clotting enzyme. *J. Biol. Chem* 252: 2178, 1977.
67. Tennet, D.M.; Ott, W.H. Tolerance to Bacterial Pyrogens in the Rabbit. *J. Am. Pharm. Assoc.* Vol. 42, No.10, 1953. p. 614.
68. Tortora, Gerard J. Microbiology, An Induction, 4^a ed. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, California, 1992, pp. 400-401 / 77-78.
69. Tóth, S.S., Gy, W. and Remeny, Z.S. Studies on the Sensitivity and Reproducibility of Pharmacopeia Pyrogen Testing. *Develop. Biol. Standart*, Vol 34, 1977. pp. 75-84.
70. Turco, Salvatore. Sterile Dosage Forms, 2^a ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1980, pp. 44-48.

BIBLIOGRAFÍA.

71. Volk. Microbiología General. Editor: al Interamericana. México D.F. 1988 3ª ed. pp. 430-434.
72. Ward P.A.Hill, J.H., Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 141, pp. 898-900, 1972.
73. Wilson Marion E. Microbiology in Patient Care 2ª ed. Micmillan Publishing CO. Inc. New York 1978. pp. 154.
74. Willig H. Sidney. Good Manufacturing Practices for Pharmaceuticals. 2ª ed. Marcel Dekker, Inc. New York 1982. 163, 91-92.
75. Wolff, S.M. Biological Effects of Bacterial Endotoxin in Man. J. Infect. Dis. Vol. 128 (Supplement), 1973. p. 259.
76. Yen, Hung-Yueb y Jacobs, Diane, Characterization of lipopolysaccharide fractions and their interactions with cells and model membranes, Journal of bacteriology, enero 1992, pp. 336-341.
77. Yin, C. Galanos, Picogram-sensitive assay for endotoxin: Gelation of Limulus polyphemus blood cell lysate induced by purified lipopolysaccharides and lipid A from Gram-negative Bacteria. Biochim. Biophys Acta, 261, 284 (1972).

BIBLIOGRAFÍA.

78. Yonng, E.J, y Carvel, M.J, Brucellosis: Clinical and laboratory Aspectos. Boca Zaton, FLA: CRC PRESS, INC, 1989.
79. Youmans, Guy P. Manual de infectología. 2ª ed. Interamericana. McGraw-Hill. México 1986. pp. 100, 111, 112.
80. Avis, Kenneth E. Pharmaceutical Cosage forms. Parenteral Medications. Vol. II. Marcel Dekker, INC. New York, 1986, pp. 518, 528, 602.
81. Cabello, Romer. Microbiología y parasitología humana, 1ª ed. Editorial Médica Panamericana, Bogotá, 1993, pp. 67.
82. Mac Genirie and Mac Genitic, Natural History of Marine Animals, 2ª ed. Ed. Mc Graw Hill, N. Y., 325, 1959.

BIBLIOGRAFÍA.

78. Yong, E.J, y Carvel, M.J, Brucellosis: Clinical and laboratory Aspectos. Boca Zaton, FLA: CRC PRESS, INC, 1989.
79. Youmans, Guy P. Manual de infectología. 2ª ed. Interamericana. McGraw-Hill. México 1986. pp. 100, 111, 112.
80. Avis, Kenneth E. Pharmaceutical Cosage forms. Parenteral Medications. Vol. II. Marcel Dekker, INC. New York, 1986, pp. 518, 528, 602.
81. Cabello, Romer. Microbiología y parasitología humana, 1ª ed. Editorial Médica Panamericana, Bogotá, 1993, pp. 67.
82. Mac Genirie and Mac Genitie, Natural History of Marine Animals, 2ª ed. Ed. Mc Graw Hill, N. Y., 325, 1959.