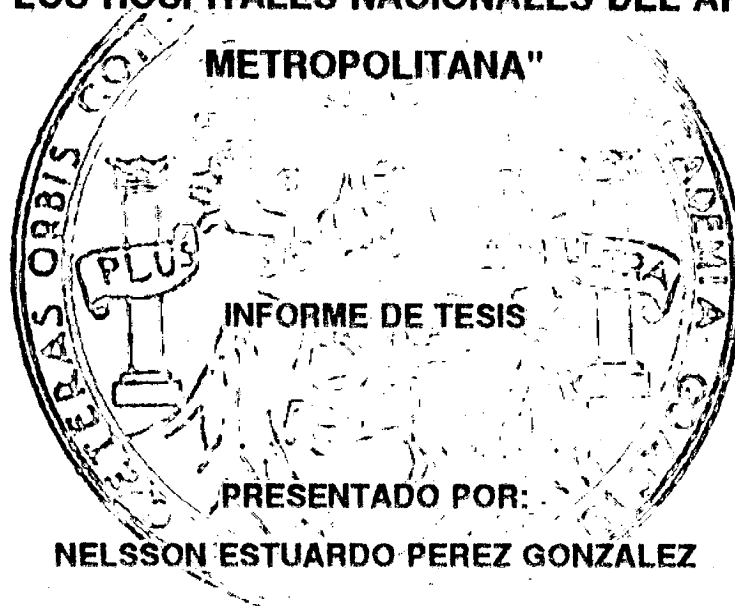


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**"EVALUACION DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS (PIROGENOS)
DE LOS PARENTERALES MASIVOS DE MAYOR CONSUMO
EN LOS HOSPITALES NACIONALES DEL AREA
METROPOLITANA"**



**PARA OPTAR AL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO**

GUATEMALA OCTUBRE DE 1996.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

D6
Op
T(1733)

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
Y FARMACIA**

DECANO	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
SECRETARIO	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
VOCAL I	Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez
VOCAL II	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
VOCAL III	Lic. Rodrigo Herrera San José
VOCAL IV	Br. Ana María Rodas Cardona
VOCAL V	Br. Hayro Oswaldo Garcia Garcia

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: Porque en El está la sabiduría, el consejo y la inteligencia.

A JESUCRISTO: Con amor y humildad, por ser mi amigo fiel, el que me ayuda en los buenos y malos momentos.

A MI MADRE: Rosa Gonzalez de Cámara, por su sacrificio, por su amor, comprensión, apoyo incondicional y por creer siempre en mí. La meta que hoy alcanzo le pertenece.

A MI PADRE Y

HERMANAS: Fredy, Sybil y Rosa Idalia, con mucho amor, por su apoyo, cariño y comprensión.

A MI FAMILIA Y

AMIGOS: Con profundo respeto y cariño.

DEDICO ESTA TESIS

A Dios Todopoderoso

A Mis Padres

A Mis Hermanas

A mi Tía Letty y mis primos Manolo y Prime Rose

A mi Abuelita Epifanía Ralda Prado ♦♦

A la Licda. Haydee Paniagua de Díaz

A la Licda. Luz Emilia Roldán de Alvarez

A la Licda. Raquel Pérez Obregón

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

**Al Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos
(L.U.C.A.M.)**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que colaboraron en la realización del presente trabajo y en mi formación profesional, especialmente:

- A mi madre por su incomparable apoyo, por sus alentadoras palabras de esfuerzo y toda la motivación que sembró en mí.
- A la Licda. Haydee Paniagua de Díaz, por su apoyo constante, por sus múltiples consejos y allmentar en mí el espíritu de salir siempre adelante.
- A la Licda. Noemí Orozco, por su orientación y ejemplo profesional.
- A la Licda. Luz Emilia Roldán de Alvarez, por su paciencia, confianza y constante asesoría en el desarrollo de esta investigación.
- A la Licda Raquel Pérez Obregón por sus múltiples sugerencias y comentarios.
- Al Lic. Estuardo Serrano y Licda. Lorena Cerna revisores del presente trabajo.
- A Lic. Beatriz Batres de Jimenez, por brindarme múltiples conocimientos y ayuda en mi Ejercicio Profesional Supervisado y revisión de Tesis.
- A la Licda. Elena Torres por su motivación y valiosa ayuda en mi trabajo experimental de tesis.
- Al personal del Departamento de Ensayos Biológicos del L.U.C.A.M.: Delfi, Irma, Perla, gracias por su desinteresada y valiosa ayuda.
- A la Licda. Carmen Leonor Barillas, por su valioso y generoso aporte para la culminación del trabajo experimental de mi tesis.
- Al Laboratorio Associates of Cape Cod. Inc. MA. USA, con eterna gratitud, por incentivar e impulsar el espíritu de investigación.
- Al Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (L.U.C.A.M.) por permitir la realización del trabajo experimental de mi tesis.
- A los Hospitales Nacionales: Roosevelt y San Juan de Dios por colaborar en la realización de mi estudio.

INDICE

TEMA	PAGINA
01) Resumen.....	01
02) Introduccion.....	02
03) Antecedentes.....	03
04) Justificaciones.....	08
05) Objetivos.....	09
06) Hipótesis.....	10
07) Materiales y Métodos.....	11
08) Resultados.....	22
09) Discusión de Resultados.....	29
10) Conclusiones.....	33
11) Recomendaciones.....	34
12) Referencias.....	35
13) Anexos.....	38

1. RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó la concentración de endotoxinas bacterianas (pirógenos) en los parenterales masivos de mayor consumo en los Hospitales Nacionales del Area Metropolitana (Hospital "A" y Hospital "B"), utilizando el Lisado de Amebocitos de Limulus (Test L.A.L.) como prueba para determinar endotoxinas, según la USP XXIII.

Para realizar dicho estudio se muestreó según el diseño estadístico y por el consumo en cada Hospital, 48 muestras en el Hospital "A" y 22 muestras en el Hospital "B", de las cuales el 50% fué Solución Hartman (Lactato Ringer) y el otro 50% fué Solución Salina (Solución Salina Fisiológica). El muestreo de los parenterales masivos fué aleatorio en presentaciones de 500 mL y 1000 mL, unos comprados por el Hospital "B" a una casa proveedora y otros elaborados en el Hospital "A".

Del total de las muestras en el Hospital "A" se muestreó el 77% del estudio y en el Hospital "B" el 23% restante. Los resultados indican que en el Hospital "A", 6 muestras (12.5%) estaban contaminadas con endotoxinas bacterianas con una concentración mayor al límite establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos, USP XXIII (0.50 UE/mL), 4 Soluciones Hartman (8.33%) y 2 Soluciones Salinas (4.17%). En el Hospital "B" (23% del estudio) ninguna muestra demostró tener una concentración de endotoxinas mayor a 0.50 UE/mL.

Esto indica que los parenterales masivos del Hospital "A" no cumplen con el límite máximo permitido de endotoxinas bacterianas según la USP XXIII y el Hospital "B" si cumple con dicho límite.

2. INTRODUCCION

En los Hospitales Nacionales el uso de parenterales masivos está ampliamente difundido, por la variedad de aplicaciones y terapias a toda clase de pacientes, representando un producto farmacéutico de gran consumo y utilidad.

Un problema conocido, desde que se inició la terapia endovenosa es la reacción febril que se manifiesta después de la administración de una solución parenteral conociéndose un tipo de respuesta originado por los pirógenos (endotoxinas bacterianas) que provocan en el paciente una serie de reacciones tales como: fiebre, respiración deficiente, cianosis, cefalea, sudor intenso, escalofríos, náuseas, vómitos, trastornos gastrointestinales y otros trastornos farmacológicos. De esta forma las endotoxinas bacterianas son los pirógenos que preocupan a la Industria Farmacéutica fabricante de soluciones parenterales masivas.

El Lisado de Amebocitos de *Limulus* (L.A.L.) se emplea para la detección de endotoxinas bacterianas, componentes éstos de las paredes celulares de bacterias gramnegativas. La prueba puede ser cualitativa y cuantitativa para detectar la endotoxina, reaccionando con una cantidad mínima de endotoxina formando un gel firme.

El L.A.L. es la prueba más sensible existente para detectar endotoxinas producidas por bacterias gramnegativas y el procedimiento es simple, específico, rápido, sensible y económico, comparándolo con la prueba de pirógenos en conejos de la U.S.P.

En este trabajo se evaluaron 70 parenterales masivos utilizando L.A.L., el 77% correspondió al Hospital "A" y el 23% del muestreo al Hospital "B", de las cuales un 50% correspondió a la Solución Hartman (Lactato Ringer) y el otro 50% a la Solución Salina (Solución Fisiológica), en presentación de 1000 y 500 mL, para obtener una mayor representatividad de la muestra. La selección de la muestra se realizó por conveniencia dependiendo del consumo, el diseño de la investigación es un diseño estratificado proporcional por Hospital y por tipo de parenteral masivo.

3. ANTECEDENTES

3.1 Introducción:

El reactivo de Lisado de Amebocitos de Limulus (L.A.L.) se emplea para la detección de pirógenos, componentes estos de las paredes celulares de las bacterias gramnegativas. La prueba puede ser cualitativa para detectar la presencia de endotoxina o también cuantitativa para determinar la concentración de endotoxina.

El Lisado de Amebocitos de Limulus (L.A.L.) reacciona en presencia de una cantidad mínima de endotoxina (pirógeno) formando un gel firme. Actualmente es una alternativa para determinar pirógenos aparte de la respuesta febril de los conejos que está siendo descontinuada para los parenterales masivos.

En la actualidad la aplicación principal de la prueba del Limulo parece encontrarse en aquellos laboratorios que precisan utilizar grandes cantidades de agua apirógena para la preparación de fármacos parenterales, utilizando sistemáticamente el control de los pirógenos en las diferentes fases de la fabricación, constituyendo una prueba muy sensible, económica y fiable. El uso de esta prueba está aprobado por el B.O.B. (Bureau of Biologics of the U.S. Food and Drug Administration), el B.M.D. (Bureau of Medical Devices of the U.S. F.D.A.) y por la USP XXIII.

3.2 Naturaleza de los Pirógenos:

La naturaleza de los pirógenos se comprendió al saberse que la contaminación pirógena está asociada con la existencia de enterobacterias conocidas también como bacterias gram-negativas (G, N, B). El componente pirogénico de estos organismos es la endotoxina, complejo de lipopolisacáridos que se encuentran en la capa más externa de la pared celular. El término pirógeno se empleó para describir a este contaminante porque el principal y más potente efecto biológico es su capacidad para producir fiebre.

Los tejidos intactos tales como la pared interna del sistema gastrointestinal y la piel sana actúan como barreras protectoras frente a la intrusión de las endotoxinas bacterianas; por lo tanto los pirógenos solamente constituyen una amenaza para el hombre cuando llegan al sistema circulatorio por medio de una inyección o a través de un tejido lesionado.

La administración de drogas parenterales, inadvertidamente contaminadas con endotoxina, pueden inducir muchas respuestas biológicas, así la reacción pirógena puede manifestarse en liberación de histamina y alteración de la permeabilidad vascular. Estas respuestas pueden poner o no en peligro la vida del individuo, dependiendo del estado del paciente y de la cantidad de endotoxina inyectada. Las endotoxinas son muy potentes; una dosis de solamente 1 a 10 ng/kg de endotoxina purificada es capaz de provocar en el hombre una respuesta febril (4,5).

3.3 Problema de endotoxinas en la Industria Farmacéutica:

Si bien las endotoxinas no son los únicos agentes pirógenos, las endotoxinas son los pirógenos que preocupan a la industria farmacéutica preparadora de soluciones parenterales,

Las otras fuentes de pirogenicidad (contaminación química o por partículas) pueden ser controladas siguiendo unos métodos de fabricación cuidadosos, pero las endotoxinas son difíciles de eliminar porque resisten la degradación por esterilización con vapor y no se eliminan tampoco por los medios normales de filtración. Lo más importante: la endotoxina es patógena en la naturaleza por lo que todas las superficies y aguas no tratadas deben considerarse en principio como pirógenas. Las bacterias gram-negativo crecerán en las soluciones con un mínimo de nutrientes, tales como el agua almacenada después de la destilación desionización. Generalmente es antieconómico y en ocasiones prácticamente imposible, eliminar la contaminación pirógena una vez que se halla presente en una fórmula. Por consiguiente el interés de la industria farmacéutica se centra en tomar las medidas preventivas para asegurar que la producción se inicia con componentes exentos de pirógenos.

Debe tomarse en cuenta que para eliminar pirógenos existen dos distintos mecanismos de despirogenización: por remoción y por inactivación. Algunos ejemplos de despirogenización por remoción son: la destilación, la ultrafiltración, osmosis reversa, remoción con carbón activado, el lavado con agua despirogenizada, etc. Algunos ejemplos de despirogenización por inactivación son: hidrólisis ácido-base, oxidación, alquilación, tratamiento con calor seco, tratamiento con calor húmedo, etc. (4,5).

Ver anexo # 2.

3.4 Aplicaciones del L.A.L.:

La prueba del L.A.L. para la detección de endotoxinas puede emplearse sobre cualquier solución acuosa, no inhibidora en la que pueden determinarse y cuantificarse concentraciones mínimas de endotoxina. Tal vez el área de mayor aplicación sea el control de calidad del agua en la industria farmacéutica, hospitales y manufactura de productos hospitalarios (suturas, agujas, etc.). La industria de productos biológicos está utilizando la prueba de Límulo para cuantificar los niveles de endotoxina en vacuna.

Kreeftenberg y Fumarola demostraron claramente la necesidad de aplicar la prueba del Límulo como control de calidad de los medios de cultivo de tejidos y otros materiales usados en inmunología, puede detectarse también septicemia gram-negativo y artritis pirógena gramnegativo limitadamente debido a los factores inhibitorios que se encuentran en la sangre y el líquido sinovial, se le ha encontrado utilidad en la detección de la presencia de bacterias gramnegativo o de las endotoxinas que producen en otros fluidos corporales. Se han descrito procedimientos para detectar meningitis gramnegativo, bacteriuria gramnegativo, uretritis gonococal (4,7,8). Posiblemente por la poca utilización de esta técnica de LAL, en nuestro país, no existen estudios relacionados, para evaluar pirógenos, actualmente la técnica más utilizada para evaluar pirógenos es utilizando conejos (2,12).

Peró relacionado con pirógenos se encontraron los siguientes estudios:

Carrillo Reeves L., Estudio de los principales factores responsables de la formación de pirógenos en productos parenterales. "Estableció que trabajando en una área libre de polvo, protegiendo la solución del aliento del operador y con agua y materia prima exenta de pirógenos, puede prolongarse el tiempo sin esterilizar la solución inyectable hasta 8 horas, sin riesgo de que haya formación de pirógenos", (13).

Morales Ruano V., Nuevas técnicas para determinar la presencia de pirógenos en productos parenterales. "Describió la técnica de la USP utilizando conejos y la técnica del LAL, como alternativas para la evaluación de productos parenterales", (14).

De acuerdo a la revisión bibliográfica se encontraron otros estudios relacionados con la técnica del LAL:

Bowman R.A.; Medley A.S.; Karthigasu K.T., LAL en el diagnóstico de peritonitis en pacientes que reciben tratamiento peritoneal continuo. "Evaluaron el LAL, para diferenciar peritonitis gramnegativo de grampositivo en pacientes que recibían diálisis peritoneal ambulatoria CAPD, donde el LAL fué específico pero insensible para el diagnóstico de CAPD peritonitis, y recomendaron que los laboratorios evaluaran sus



procedimientos Gram para incrementar la sensibilidad ya que el LAL no era un sustituto satisfactorio"; (15).

Brandtzaeg P., et. al., Endotoxina meningococal en un shock séptico de plasma letal, estudiado por Cromatografía de gases y espectrometría de masas, ultracentrifugación, microscopía electrónica. "Compararon un análisis de cromatografía y espectrometría de masas con el LAL, para cuantificar los Lipopolisacáridos en 5 plasmas de pacientes que contienen mas de 5 microgramos / litro por LAL, donde los resultados fueron confirmados por GC, MS"; (16).

Peer G., et. al., Diagnósticos previos de peritonitis negativo en pacientes ambulatorios con el Lymulus Amebocyte Lysate Assay (LAL). "Utilizaron el LAL, para diagnosticar peritonitis en pacientes ambulatorios, donde lo estudiaron en 36 episodios consecutivos, donde el LAL fué positivo en todos los episodios de peritonitis negativo, concluyeron que el LAL es un método rápido y sensible para la diferenciación de peritonitis negativo y positivo y ayuda a determinar una terapia con antibiótico más apropiada y eficaz"; (17).

Van Den Berg C., et. al., Retraso en el antibiótico induce la lisis de *E. coli* in vitro, relacionado con la liberación de Lipopolisacáridos. "Utilizaron un LAL cinético para estudiar los efectos de la gentamicina, amoxicilina y ciprofloxacina para liberar lipopolisacáridos en diferentes etapas del crecimiento de *E. coli* 055 B5 H colonia in vitro"; (18).

Mazor M., et. al., LAL, para diagnosticar una infección intraamniótica. "Utilizaron el LAL, para diagnosticar una infección intraamniótica donde el LAL fué positivo con una sensibilidad de 81.8%, y concluyeron que el LAL es una prueba simple, rápida y sensitiva para detectar infecciones intraamnióticas en mujeres en periodo prenatal"; (19)

Vanholder R., et. al., Endotoxinas transferidas a través de diálisis: membranas de poros grandes versus membranas de poros pequeños. "Evaluaron las endotoxinas a través de un estudio in vivo donde utilizaron el test de LAL satisfactoriamente, para determinar la presencia o ausencia de la endotoxina en la diálisis"; (20).

Balint G.A., Análisis adicional de los efectos pirógenos del ricino. "La proteína tóxica de las semillas de aceite de castor, (*Ricinus comunis*, Euforbiaceae) si es administrado intra-peritonealmente en dosis subletales causan fiebre en una dosis dependiente en los siguientes mamíferos: conejos, gatos, cerdos, ratas y monos. Esta propiedad conocida del ricino llama la atención como una sustancia pirógena en el uso de nuevas drogas antipiréticas"; (21).

Nakata T., Destrucción de endotoxinas típicas, por medio de calor seco como es determinado utilizando LAL y pirógenos. "Utilizó el LAL, para evaluar la eficiencia del calor seco en la destrucción de endotoxinas utilizando para ello *E. coli* y *Salmonella sp.* y concluyó que efectivamente con calor seco es sumamente rápida la eliminación"; (22).

Hollander A., et. al., Inhibición y estimación en el análisis de endotoxinas aéreas en varios ambientes. "Estudiaron la inhibición en los efectos en el LAL, estudiando en series de exposiciones de muestras de endotoxinas de varios ambientes ocupacionales dos tipos de análisis se llevaron a cabo con varias diluciones y varias muestras, la concentración de endotoxinas dependiendo de la dilución en la cual la muestra es analizada, concluyeron que existen conclusiones falsas acerca de la exposición y los efectos en la salud puede interferir con la técnica"; (23).

4. JUSTIFICACIONES

Actualmente en los Hospitales Nacionales del Area Metropolitana, existe un alto consumo de parenterales masivos de Solución Hartman y Solución Salina, según un estudio piloto de 6 meses (anexo # 1), lo que hizo necesario realizar un control de calidad para determinar pirógenos a dichos productos, para establecer que cumplen con los requerimientos de calidad que exigen los Organismos Reguladores, disminuyendo así los riesgos de agravar la condición de pacientes si se les administraran parenterales masivos que no cumplieren con las exigencias de calidad.

Por lo anterior se justifica la realización de este trabajo y para ello se utilizó el método de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (L.A.L.), para detectar endotoxinas bacterianas in vitro.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERALES:

5.1.1 Aportar a los Hospitales Nacionales del Area Metropolitana información sobre la calidad de los parenterales masivos que fabrican y que adquieren de proveedores.

5.2 ESPECIFICOS:

5.2.1 Evaluar la presencia de endotoxinas bacterianas (pirógenos) en los parenterales masivos de mayor consumo (Solución Hartman y Solución Salina) de los Hospitales Nacionales del Area Metropolitana, a través de la prueba de Lisado de Amebocitos de Límulus (L.A.L.).

5.2.2 Establecer las condiciones adecuadas para comprobar la efectividad de la prueba de Lisado de Amebocitos de Límulus (L.A.L.) para detectar endotoxinas bacterianas en parenterales masivos.

6. HIPOTESIS

Los parenterales masivos: Solución Hartman y Solución Salina, consumidos en los Hospitales Nacionales del Area Metropolitana, cumplen con la prueba de endotoxinas bacterianas (pirógenos) según la USP XXIII.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO:

El universo de trabajo estuvo constituido los parenterales masivos que se consumen en los Hospitales Nacionales del Area Metropolitana. (Hospital "A" y Hospital "B")

De la población se seleccionaron 70 parenterales masivos, el 77% del muestreo correspondió al Hospital "A", y el 23% restante al Hospital "B", de los cuales el 50% correspondió a la Solución Hartman (Lactato Ringer), y el otro 50% a la Solución Salina (Solución Salina Fisiológica), (ambos en presentación de 1000 mL y 500 mL) aleatoriamente, por ser los parenterales masivos de mayor consumo.

7.2 MEDIOS:

7.2.1 Recursos Humanos:

- Tesisista: Br. Nelsson Estuardo Pérez González
- Asesora: Licda. Luz Emilia Roldán de Alvarez (Q.B.)
- Coasesora: Licda. Raquel Pérez Obregón (Q.F.)

7.2.2 Recursos Institucionales:

- Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
- Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM)

7.2.3 Recursos Materiales:

- Reactivo de Lisado de Amebocitos de Limulus (L.A.L.) Pyrotell®
- Endotoxina estándar u control

- Endotoxina estándar USP
- Agua despirogenizada calidad USP
- Tubos de ensayo soda-lime, 10 x 75 mm despirogenizados
- Pipetas serológicas graduadas
- Beaker
- Erlenmeyer
- Tubos de ensayo 15 x 150 mm despirogenizados
- Papel aluminio
- Tips (puntas para pipeta automática)
- Pipeta automática
- Jeringas descartables
- Papel parafilm "M"
- Horno 180 - 250 °C
- Gradillas para tubos de ensayo
- Baño de Agua no circulante 37°C ± 1°C
- Bandejas de Acero Inoxidable
- Mechero
- Tijeras
- Estufa
- Congelador

7.3 DISEÑO DE INVESTIGACION:

MUESTREO:

El diseño de muestreo es un diseño estratificado proporcional por Hospital y tipo de suero.

Se muestrearon 70 sueros de los cuales, 48 sueros correspondieron al Hospital "A" equivalente al 77% del estudio y 22 sueros que correspondieron al Hospital "B" que fué el 23% restante del estudio, de los cuales un 50% correspondió a la Solución Hartman (Lactato Ringer) y el otro 50% a la Solución Salina (Solución Salina Fisiológica), en presentación de 500 y 1000 mL por duplicado.

La selección de la muestra fué por conveniencia en base al consumo de cada Hospital.

ANALISIS DE RESULTADOS:

Los resultados de este estudio fueron analizados a través de cuadros de resultados y gráficas de pastel. En dicho análisis descriptivo se grafica de manera porcentual que muestras presentaron endotoxinas bacterianas del total del estudio y por Hospital.

Los cuadros se incluyen en la sección de resultados e indican que muestras presentaron endotoxinas, un resultado positivo (+) indica la presencia de endotoxinas y un resultado negativo (-) indica la ausencia de endotoxinas según el límite permitido por la USP XXIII el cual es de 0.5 UE/mL (1).

7.4 PROCEDIMIENTO:

EL LISADO DEL AMEBOCITO LIMULUS

7.4.1 RESUMEN DE LA PRUEBA:

El lisado del amebocito Limulus es un extracto acuoso de las células sanguíneas (amebocitos) proveniente del cangrejo herradura, *Limulus polyphemus*. La prueba LAL se realiza añadiendo 0.1 mL de LAL (Pyrotell®) reconstituido a 0.1 mL de la muestra de prueba en un tubo de ensayo de vidrio (soda lime) despirogenado de 10 x 75 mm. La solución se mezcla enteramente y se coloca inmediatamente en un bloque incubador seco o en un baño de agua no circulante a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 60 ± 2 minutos. Al final del período de incubación, el tubo es removido de la incubadora e invertido. Si se ha formado un gel y permanece intacta en el fondo del tubo de ensayo después de la inversión de 180° , la prueba es positiva; la concentración de endotoxina en este tubo es mayor o igual que la sensibilidad del LAL, (Pyrotell). Cualquier otro estado de la mezcla de reacción constituye una prueba negativa indicando una concentración de endotoxina menor que la sensibilidad del LAL. Aún si se ha formado una gel pero se rompe o se colapsa en la inversión, la prueba es negativa. La prueba LAL es rápida, específica, fácil de realizar y altamente sensible. El LAL puede detectar como mínimo 0.03 Unidades de Endotoxina (EU) por mL, usando la técnica de coagulación del gel.

7.4.2 REACTIVO:

El Lisado del Amebocito Limulus (LAL) Pyrotell® es empacado en forma liofilizada en tamaños de 1, 2, ó 5 mL/vial lleno. El Pyrotell® contiene solamente un extracto acuoso de amebocitos de *L. polyphemus*, 1.5% v/v de albúmina sérica humana al 25% (estabilizador), 3% de NaCl, y otros iones apropiados. No se ha agregado ningún preservante, buffer u otros ingredientes.

Associated of Cape Cod, Inc. ofrece lotes individuales de LAL, (Pyrotell®) en rangos de sensibilidad desde 0.03 hasta 0.5 EU/mL basados en el Standard de Referencia USP de Endotoxina (también referido como la endotoxina standard de referencia o RSE). La sensibilidad, λ , es la concentración mínima o RSE que produce una coagulación firme del gel bajo condiciones standard. La sensibilidad del lote, EU/mL, se imprime sobre el vial y las etiquetas de empaque.

Se utiliza Pyrotell® (LAL) para propósitos de diagnóstico in vitro únicamente. No debe utilizarse para la detección de endotoxemia. La toxicidad de este reactivo no ha sido determinada; además, debe tenerse cuidado cuando se maneja el Pyrotell®.

7.4.3 RECONSTITUCION DE LAL (Pyrotell®):

1. Suavemente golpee el vial del Pyrotell® para que el LAL suelto caiga hacia el fondo del vial. Remueva el sello crimp y rompa el vacío levantando el tapón gris. No contamine la boca del vial; no inyecte a través o reuse el tapón. Una pequeña cantidad de LAL dejada en el tapón no afectará la prueba. Cubra el vial con Parafilm "M" cuando no esté en uso.

2. Reconstituye el Pyrotell® con Agua de Reactivo LAL (Agua despirogenizada, ver "Reactivos Test"). Agregue 1.0, 2.0 ó 5.0 mL de agua despirogenizada como se indica en la etiqueta del vial. El LAL liofilizado se convertirá en solución en unos pocos minutos. Antes de su uso, mezcle suavemente los contenidos del vial para asegurar la homogeneidad. La mezcla muy vigorosa puede causar espuma excesiva la cual causa una pérdida de la sensibilidad.

7.4.4 RECOLECTA DE LA MUESTRA Y PREPARACION:

Las muestras deberían ser recolectadas asépticamente en contenedores no pirogénicos. Los plásticos de poliestireno, estériles, de cristalería despirogenada, desechables son recomendados para minimizar la adsorción de endotoxinas en las superficies del contenedor. No todos los contenedores plásticos están libres de endotoxinas detectables y una sustancia extractable proveniente de algunos tipos puede interferir con la prueba LAL. Los contenedores (seleccionados al azar del lote) pueden ser lavados con un pequeño volumen de agua

despirogenizada (a temperatura ambiente por una hora) y jabón alcalino, luego es analizado como una muestra para determinar si el batch es aceptable.

El pH de la mezcla de reacción (muestra agregada al Pyrotell®) deberá ser de 6 a 8. Ajuste el pH de la muestra con HCl, NaOH, ó buffer (libre de endotoxina detectables). Diluya el HCl o el NaOH concentrado con agua despirogenizada para normalidades que no llevarán a una significativa dilución de la muestra de prueba cuando sea ajustado. No ajuste el pH de un no buffer salino o del agua.

Las sustancias que desnaturalizan las proteínas, cationes de quelatos, endotoxina unida o estado hidrofóbico de la endotoxina alterado, pueden interferir con la prueba. La interferencia puede ser detectada cuando se recupera una cantidad significativamente menor o mayor de endotoxina que la esperada cuando una se agrega una cantidad conocida de endotoxina standard a la muestra (vea "Limitaciones del Procedimiento", Anexo # 3). En muchos casos, la dilución de la muestra reducirá la concentración y la actividad de las sustancias interferentes y aún darán resultados válidos de la prueba. Los controles apropiados y los esquemas de dilución se discuten bajo "Procedimiento de la Prueba".

Las muestras deberían ser analizados tan pronto como sea posible después de la recolecta. Puede ser aconsejable congelar una muestra no estéril que será almacenado o embarcado antes del análisis. Las muestras que se espera que contengan bajas concentraciones de endotoxina (menos de 1 EU/mL) deberían ser analizadas para pérdida de endotoxina durante el almacenamiento.

7.4.5 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA:

Reactivos de la Prueba:

1. Viales de LAL (Pyrotell®) multiprueba (ver descripción y método de reconstitución en la sección arriba).
2. Agua Despirogenizada para Reconstituir. El LAL (Pyrotell®) liofilizado debe ser reconstituido con agua que muestra, ninguna endotoxina detectable en la prueba LAL. Debe utilizarse Agua Esteril USP para Inyección o Irrigación. El límite de endotoxina para el agua para inyección USP es 0.25 EU/mL; por lo tanto, el agua para inyección puede tener endotoxinas detectables cuando se analiza con un LAL (Pyrotell®) más sensible. Para certificar un nuevo lote de agua como agua despirogenizada, se reconstituye el Pyrotell® y haga diluciones de endotoxina standard con un nuevo lote de agua para confirmar la sensibilidad del Pyrotell®. Si la sensibilidad de la prueba del lote es confirmada y el control negativo muestra ningún aumento en la viscosidad y ninguna

precipitación floculente, el agua es adecuada para su uso. Use agua despirogenizada para reconstituir Pyrotell® y los estándares de endotoxinas y para diluir los estándares de endotoxina y las muestras de prueba. 3. La Endotoxina Estandar Control (CSE), se usa para confirmar la sensibilidad del LAL, validar el producto y preparar los controles de inhibición. Cada vial contiene un peso medido de endotoxina. El Estandar de Referencia USP de Endotoxina puede ser obtenido de la Convención de Pharmacopea de los Estados Unidos, Inc.. Los lotes de CSE pueden mostrar potencias diferentes (EU/ng) cuando se analiza con varios lotes de LAL, (Pyrotell®).

Materiales y Equipo: 1. Tubos de ensayo, de 10 x 75 mm, despirogenados, de vidrio (soda lime). Algunas marcas exhiben propiedades inhibitorias con ciertos lotes de Pyrotell®. 2. Baño de agua no circulante o bloques incubadores secos capaces de mantener $37 \pm 1^\circ\text{C}$. 3. Pinzas para tubo de ensayo para manejar y/o incubar los tubos de ensayo. 4. Pipetas, pipeteadores automáticos con filtros de pipeta, o pipeteadores con jeringas plásticas. Se recomiendan estériles y desechables. 5. Mezclador, tipo Vortex. 6. Parafilm "M". El lado en contacto con la papel normalmente no es pirogénico. 7. Los tubos de ensayo no pirogénicos con una adecuada capacidad para hacer diluciones de standard de endotoxina o la muestra que se analiza (15 x 150 mm de tubos de ensayo de vidrio con tapaderas de bakelita son reusables y convenientes). 8. Horno de aire caliente con capacidad de 180 a 250°C para despirogenación de la cristalería. Los ciclos de despirogenación recomendados son a un mínimo de 180°C por 3 horas o 250°C por 30 minutos.

7.4.6 CONTROLES:

1. Controles de Endotoxina.

a. Series estandar de Endotoxina. Prepare un set fresco de diluciones de la solución stock de endotoxina cada día. Haga diluciones a manera que las series finales de diluciones de dos veces entren dentro de la sensibilidad del Pyrotell®. Las concentraciones de 2λ , 1λ , 0.5λ , y 0.25λ , son recomendadas para confirmar la sensibilidad del LAL. Use tan pocas diluciones como sea posible con volúmenes en pipeta apropiados para maximizar la precisión.

b. Controles Positivos pueden ser usados en ausencia de una serie de concentraciones estandar en ciertas circunstancias. La concentración del control positivo debe ser en número de 2.

c. Controles de producto positivos son controles de inhibición y consisten en la muestra o la dilución de la muestra a la cual se le agrega la endotoxina estandar. La concentración final de la endotoxina agregada a la muestra de prueba debe ser en número de 2 .

2. Controles Negativos. Los controles negativos de agua despirogenizada deben ser incluidos con cada batch de muestras analizadas. Durante la validación del producto o las pruebas de inhibición/incremento, la muestra utilizada para diluir la endotoxina estandar es también tratada como un control negativo.

7.4.7 PREPARACION DE LA MUESTRA PARA LA PRUEBA O ENSAYO DE LIMITES:

Diluya las muestras a la concentración requerida para realizar una prueba de límites (pasa/falla)(ver anexo # 4) o realice un ensayo por medio del análisis de una serie de concentraciones (ejemplos de los dos tipos de prueba se dan en "Resultados e Interpretación"). Las diluciones pueden ser hechas en tubos de ensayo y el volumen de prueba transferido a los tubos de reacción, o las diluciones pueden ser hechas directamente en los tubos de reacción para dejar el volumen de prueba, 0.1 mL, en cada tubo. La dilución analizada para una prueba de límites es determinada de la sensibilidad del LAL (Pyrotell®) y el límite de endotoxina para la muestra. Refiérase a las "Limitaciones del Procedimiento" (Ver anexo #3) para explicación y cálculo de la Concentración Mínima Válida (MVC) y la Dilución Máxima Válida (MVD).

7.4.8 REALIZANDO LA PRUEBA:

Una técnica consistente es necesaria para obtener resultados satisfactorios.

1. Agregue 0.1 mL de LAL (Pyrotell®) reconstituido a cada tubo de ensayo conteniendo 0.1 mL de la muestra de prueba o el control. Use una pipeta graduada (con incrementos de 0.1 mL), o un pipeteador automático o repetidor. Agregue LAL (Pyrotell®) a los controles negativos primero y desde el de más baja concentración hasta el de más alta concentración en cada serie de prueba. Una pipeta fresca o un filtro de pipeta se recomienda para cada entrada dentro del vial de Pyrotell®, (LAL). Agite los tubos vigorosamente por 20 a 30 segundos para asegurar una mezcla total.

Si hay solamente unos pocos tubos, cada uno puede ser mezclado en el vortex por 1 a 2 segundos. Una falla en la mezcla adecuada es una causa común de pruebas insatisfactorias.

2. Coloque los tubos de ensayo en agua a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ o en un baño seco por 60 ± 2 minutos. La reacción

comienza cuando se agrega LAL a la muestra de prueba pero no procede a un rango óptimo hasta que la mezcla alcanza los 37°C. Si se analizan grandes cantidades de muestras en paralelo, las pruebas deben ser por lote y deben empezarse a intervalos que permitan la lectura de cada uno dentro del límite de tiempo.

No disturba los tubos de ensayo durante el período de incubación. La reacción formadora del gel es delicada y puede ser irreversible si los tubos son manejados, agitados o vibrados. No use un baño de agua con un agitador u otro recurso de vibración. Sumerja los tubos arriba del nivel de la mezcla reaccionante pero no tan profundamente que ellos floten o se muevan en la gradilla.

3. Remueva y lea los tubos de ensayo uno a la vez. No seque los tubos o los golpee contra el lado de la gradilla durante la remoción. Invierta el tubo en un movimiento suave; no haga pausa a la mitad de la inversión a menos que sea obvio que el gel no se ha formado. Una prueba positiva se indica por la formación de un gel el cual no se colapsa cuando el tubo se invierte.

7.4.9 RESULTADOS E INTERPRETACION:

Ejemplo de Series de Endotoxina Estandard. Confirme la sensibilidad del LAL (Pyrotell®) y califique al laboratorio o al técnico por medio de la realización de la prueba LAL en una serie de concentraciones de endotoxina estandard conocidas que se encuentren en la sensibilidad indicada (i.e., 2λ , λ , 0.5λ , y 0.25λ). Para este ejemplo, la sensibilidad del LAL (Pyrotell®) es de 0.25 EU/mL.

Concentración de Endotoxina	Resultados de la Prueba
0.5 EU/ mL (2 λ)	+
0.25 EU/mL (λ)	+
0.125 EU/mL (0.5 λ)	-
0.06 EU/mL (0.25 λ)	-
Agua despirogenizada (control negativo)	-

El punto final de este ensayo se define como la concentración menor de endotoxina para dar la prueba positiva. La sensibilidad indicada del LAL, (Pyrotell®) se confirma si el punto final es más o menos una dilución de dos veces. En este ejemplo, la concentración de la endotoxina en el último tubo positivo en la serie es 0.25 EU/mL ; por lo tanto, la sensibilidad se confirma. La prueba debería ser válida (sensibilidad confirmada) si el punto final fuera 0.125 a 0.5 EU/mL (el error del método). Para mostrar un punto final de 0.125 EU/mL, el nivel de 0.06 EU/mL debe estar presente en la serie y ser negativa.

Cuando el ensayo de endotoxina se replica, la sensibilidad se expresa como la media geométrica (GM) de las sensibilidades individuales: $GM = \text{AnLog} ((\Sigma e) / f)$

donde e = suma del log de los puntos finales y f=número de puntos finales replicados.

El control negativo de agua despirogenizada debe dar una prueba negativa. Si el control negativo se coagula, el agua despirogenizada, cristalería, o el Pyrotell® (LAL) está contaminado. La mezcla debe ser clara con ningún aumento en la viscosidad. Si hay precipitación floculenta o polvo blanco indica una concentración de endotoxina menor que la sensibilidad del Pyrotell®.

En ausencia de la serie de endotoxina, un control positivo puede ser incluido con las pruebas. El control positivo a 2 es el nivel de 0.5 EU/mL en el ejemplo arriba. Si el control positivo es negativo, la sensibilidad del Pyrotell® (LAL) es menor que dos veces de la sensibilidad indicada y la prueba de la muestra es inválida. La pérdida de sensibilidad puede significar que el Pyrotell® (LAL) se ha deteriorado, la endotoxina pierde su potencia (casi siempre debido a la adsorción a una superficie del contenedor), o la prueba no ha sido conducida apropiadamente, (1,3).

7.4.10 DESPIROGENIZACION DEL MATERIAL UTILIZADO:

7.4.10.1 Lavado del material contaminado:

- Al terminar la prueba L.A.L., separar el material contaminado con endotoxinas del que no lo está.
- Colocar la cristalería contaminada y su contenido en una bandeja que contenga jabón alcalino, dejar por 15 minutos y descartar en el lavadero.
- Someter la cristalería a una temperatura de 70 a 80°C durante 30 minutos en solución de jabón alcalino pH 10-11.
- Lavar con abundante agua del chorro aproximadamente 10 veces y con agua destilada otras 10 veces.
- Poner a hervir con agua destilada por 30 minutos.
- Secar en el horno toda la cristalería.
- Colocar las pipetas en contenedores y la demás cristalería envolverla en papel de aluminio.
- Despirogenizar en horno de calor seco a 180°C por 3 horas.

7.4.10.2 Lavado del material no contaminado:

- Lavar con abundante agua del chorro aproximadamente 10 veces y con agua destilada 10 veces más.
- Poner a hervir con agua destilada por 30 minutos.
- Lavar con agua destilada 5 veces.
- Secar en el horno toda la cristalería.
- Colocar las pipetas en contenedores y la demás cristalería envolverla en papel de aluminio.
- Despirogenizar en horno de calor seco a 180°C por 3 horas.

OBSERVACIONES:

- a) El riesgo de contaminación por endotoxinas es vía endovenosa y por piel lacerada, siempre y cuando esté en concentraciones mayores de 10 unidades de endotoxina por mL.
- b) Las endotoxinas son inactivadas en medio alcalino.

7.4.11 EJEMPLO DE UN ENSAYO PARA UNA MUESTRA: Ver anexo # 5.

7.4.12 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO: Ver anexo # 6

8. RESULTADOS

Se analizaron 70 muestras de parenterales masivos de mayor consumo en los Hospitales Nacionales del Area Metropolitana, (Hospital "A" y Hospital "B") luego de haber hecho un muestreo aleatorio por duplicado de las muestras en los servicios de dichos Hospitales,. El muestreo se hizo por duplicado, ya que de encontrarse un lote con resultados positivos, debía confirmarse con la segunda muestra del mismo, para determinar con seguridad el resultado.

Se utilizó el método de Lisado de Amebocitos de Limulus (L.A.L.) con las directrices de Associates of Cape Cod, Inc., (casa fabricante de los reactivos), ya utilizado y validado en el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (L.U.C.A.M.) para determinar endotoxinas bacterianas en productos parenterales.

De todo el muestreo, 48 muestras correspondieron al Hospital "A", (77% del estudio) de las cuales 24 muestras fueron Solución Hartman y 24 fueron Solución Salina. Las otras 22 correspondieron Hospital "B"; (23% del estudio) de las cuales 11 fueron Solución Hartman y 11 Solución Salina.

Todas las muestras fueron evaluadas semi-cuantitativamente y se determinó si presentaban una concentración de endotoxinas bacterianas mayor al límite permitido por la USP XXIII que corresponde a 0.5 UE/mL para la Solución Hartman y Solución Salina.

El esquema de la secuencia del ensayo realizado en las muestras se presenta en el cuadro # 8.1.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Del Hospital "B" las 22 muestras evaluadas, estuvieron por debajo del límite aceptado para la Solución Hartman y Solución Salina por la USP XXIII, (0.5 UE/mL), teniendo así un 0% de muestras contaminadas con endotoxinas bacterianas. Ver Cuadros #8.2, y # 8.3 y gráfica # 8.3

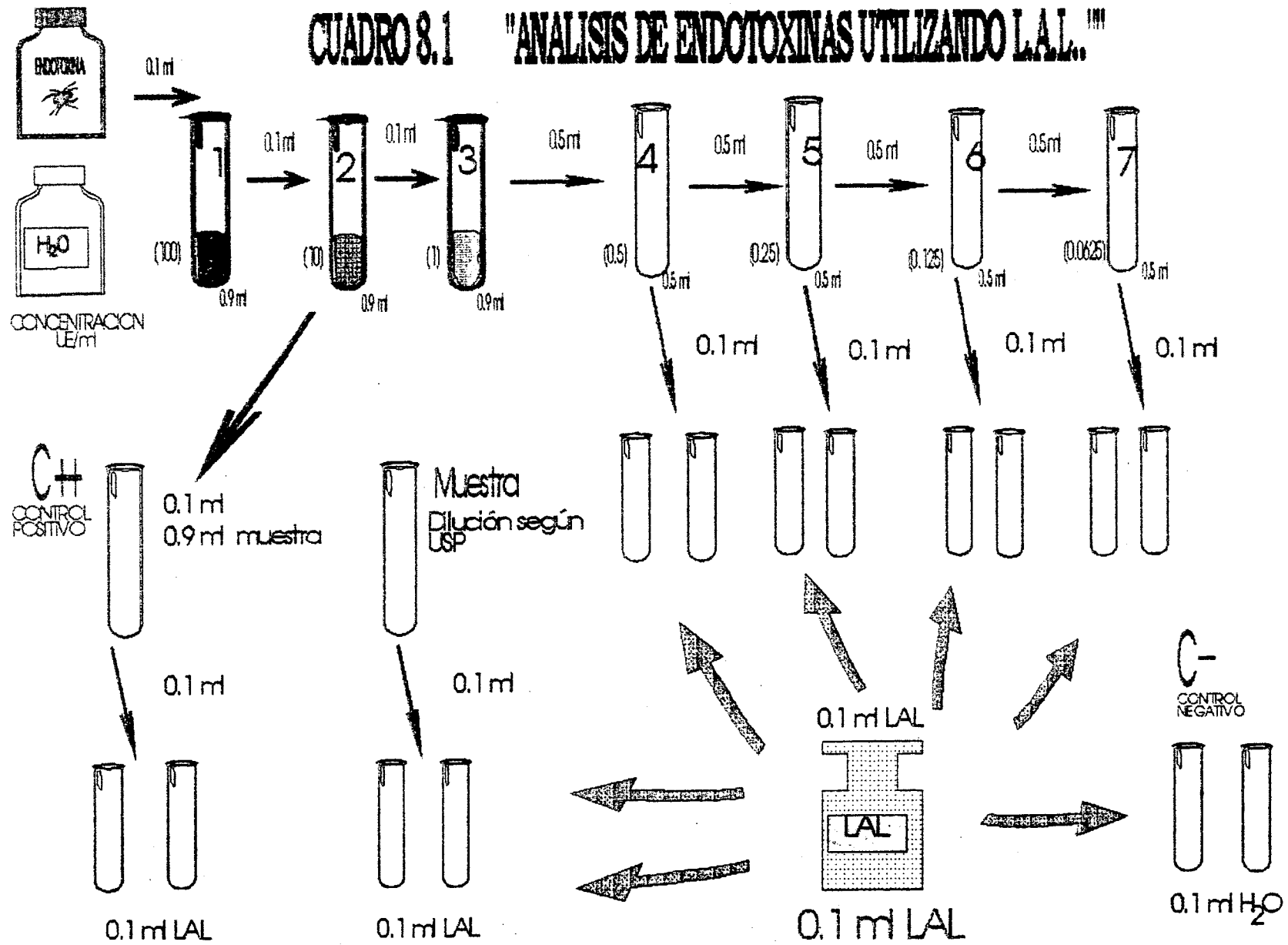
Del Hospital "A", de las 48 muestras evaluadas, se determinó que 6 muestras (12.5%), estaban contaminadas con endotoxinas bacterianas, de las cuales 4 (8.33%) correspondieron a la Solución Hartman y 2 (4.17%) correspondieron a la Solución Salina,. Ver Cuadros # 8.4, 8.5 y gráfica # 8.2.

De manera que del total del estudio (70 análisis) se determinó que el 8.57% de las muestras presentaron endotoxinas bacterianas, (las cuales correspondieron al Hospital "A") ver grafica # 8.1.

Las muestras que demostraron un valor positivo, se analizaron por segunda vez y confirmaron el primer resultado del análisis. Ver cuadro # 8.6.

El cuadro # 8.7 muestra el resultado de la curva estándar de endotoxina y los controles tanto negativos como positivos, realizado en cada ensayo de las muestras evaluadas.

CUADRO 8.1 "ANÁLISIS DE ENDOTOXINAS UTILIZANDO L.A.L."



Cuadro # 8.2

Muestras de Solucion Hartman analizadas en el Hospital "B"
Un signo + Indica la presencia de endotoxinas bacterianas

No. de	Lote	pH inicial	pH final	Muestra	Tubo #1	Tubo #2
1	5A20	6.9	6.9	1H-B	-	-
2	5A20	6.98	6.98	2H-B	-	-
3	5A20	7.03	7.03	3H-B	-	-
4	5A20	7.03	7.03	4H-B	-	-
5	5A20	6.91	6.91	5H-B	-	-
6	5A20	6.4	6.4	6H-B	-	-
7	5A20	6.33	6.33	7H-B	-	-
8	5A20	6.2	6.2	8H-B	-	-
9	5A20	6.48	6.48	9H-B	-	-
10	5A20	6.51	6.51	10H-B	-	-
11	5A20	6.55	6.55	11H-B	-	-

Cuadro # 8.3

Muestras de Solucion Salina analizadas en el Hospital "B"
Un signo + Indica la presencia de endotoxinas bacterianas

No. de	Lote	pH inicial	pH final	Muestra	Tubo #1	Tubo #2
1	6B19	7.74	7.74	1S-B	-	-
2	6E26	7.68	7.68	2S-B	-	-
3	6C28	7.48	7.48	3S-B	-	-
4	6B19	7.03	7.03	4S-B	-	-
5	6E26	6.92	6.92	5S-B	-	-
6	6C28	6.95	6.95	6S-B	-	-
7	6C28	7.3	7.3	7S-B	-	-
8	6B19	7.74	7.74	8S-B	-	-
9	6E26	7.68	7.68	9S-B	-	-
10	6C28	7.48	7.48	10S-B	-	-
11	6B19	7.03	7.03	11-B	-	-

Cuadro # 8.4

Muestras de Solucion Hartman analizadas en el Hospital "A"
Un signo + indica la presencia de endotoxinas bacterianas

No. de Analisis	Lote	pH inicial	pH final	Muestra	Tubo #1	Tubo #2
1	960309	6.77	6.77	1H-A	-	-
2	960308	6.36	6.36	2H-A	-	-
3	960201	6.28	6.28	3H-A	-	-
4	960206	6.24	6.24	4H-A	-	-
5	960313	6.18	6.18	5H-A	-	-
6	960319	6.18	6.18	6H-A	-	-
7	960204	6.39	6.39	7H-A	+	+
8	960311	6.53	6.53	8H-A	-	-
9	960310	6.39	6.39	9H-A	+	+
10	960312	6.28	6.28	10H-A	-	-
11	951034	6.31	6.31	11H-A	-	-
12	951042	6.28	6.28	12H-A	+	+
13	951035	6.26	6.26	13H-A	-	-
14	951033	6.23	6.23	14H-A	-	-
15	951039	6.63	6.63	15H-A	-	-
16	951032	6.43	6.43	16H-A	-	-
17	951030	6.35	6.35	17H-A	-	-
18	960423	6.48	6.48	18H-A	-	-
19	960417	6.36	6.36	19H-A	-	-
20	960415	6.2	6.2	20H-A	-	-
21	960424	6.4	6.4	21H-A	-	-
22	960203	6.26	6.26	22H-A	-	-
23	950526	6.36	6.36	23H-A	-	-
24	950309	6.24	6.24	24H-A	-	-

Cuadro # 8.5

Muestras de Solucion Salina analizadas en el Hospital "A"
Un signo + indica la presencia de endotoxinas bacterianas

No. de Analisis	Lote	pH inicial	pH final	Muestra	Tubo #1	Tubo #2
1	960422	6.14	6.14	1S-A	-	-
2	960202	7.11	7.11	2S-A	-	-
3	960420	6.55	6.55	3S-A	-	-
4	960419	6.3	6.3	4S-A	-	-
5	960421	7.46	7.46	5S-A	-	-
6	960317	7.06	7.06	6S-A	+	+
7	960201	7.06	7.06	7S-A	-	-
8	960204	6.64	6.64	8S-A	-	-
9	960423	6.36	6.36	9S-A	+	+
10	951028	6.22	6.22	10S-A	-	-
11	950823	7.48	7.48	11S-A	-	-
12	951030	7.2	7.2	12S-A	-	-
13	960311	7.06	7.06	13S-A	-	-
14	951031	7.03	7.03	14S-A	-	-
15	960315	6.63	6.63	15S-A	-	-
16	960314	6.87	6.87	16S-A	-	-
17	960307	6.65	6.65	17S-A	-	-
18	960306	7.75	7.75	18S-A	-	-
19	960205	7.27	7.27	19S-A	-	-
20	960316	6.84	6.84	20S-A	-	-
21	960308	6.89	6.89	21S-A	-	-
22	960415	6.61	6.61	22S-A	-	-
23	960313	6.65	6.65	23S-A	-	-
24	960314	7.46	7.46	24S-A	-	-

Cuadro # 8.6

Muestras analizadas por segunda vez, previo a un resultado positivo, el signo + indica presencia de endotoxinas bacterianas

No. de Análisis	Lote	pH Inicial	pH final	Muestra	Tubo #1	Tubo #2
1	960317	5.7	7.1	6S-A	+	+
2	960423	6.1	6.1	9S-A	+	+
3	960204	6.6	7.7	7H-A	+	+
4	960310	5.7	7.4	9H-A	+	+
5	951042	6.1	6.1	12H-A	+	+
6	960209	6.2	6.2	22H-A	+	+

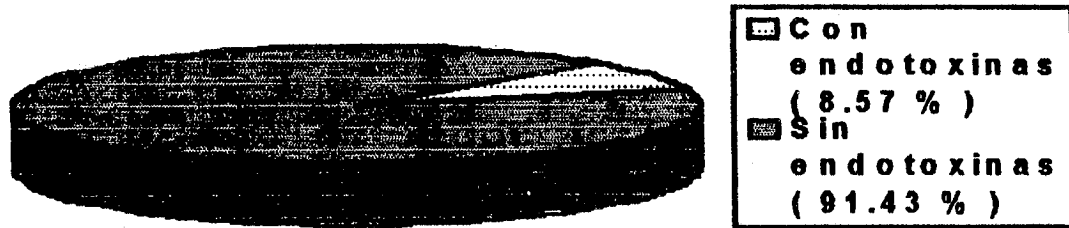
Cuadro # 8.7

Resultados de la curva estandar de endotoxina realizados en todos los analisis de muestras

Dilucion UE/mL	TUBO # 1	TUBO # 2
0.5	+	+
0.25	+	+
0.125	-	-
0.0625	-	-
Control Negativo	-	-
Control Positivo	+	+

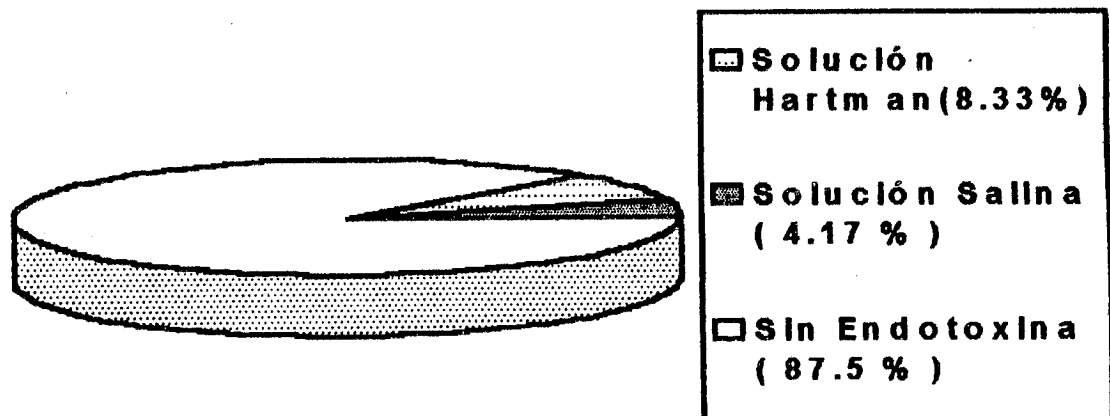
Gráfica No. 8.1

Muestras con endotoxinas del total del estudio



Gráfica No. 8.2

Muestras evaluadas del Hospital " A ".



Gráfica No. 8.3

Muestras evaluadas del Hospital " B ".



9. DISCUSION DE RESULTADOS

La contaminación pirógena está asociada con la existencia de enterobacterias conocidas también como bacterias gram-negativo, donde el componente pirogénico de estos microorganismos es la endotoxina. Los pirógenos (endotoxinas bacterianas) provocan en el paciente una serie de reacciones tales como: fiebre, respiración deficiente, cianosis, cefalea, sudor intenso, escalofríos, náuseas, vómitos, trastornos gastrointestinales y otros trastornos farmacológicos. La endotoxina purificada en concentraciones de 1 a 10 ng/kg de peso, es capaz de provocar en el hombre una respuesta febril.

Para el análisis de las muestras se utilizó el reactivo L.A.L. con una sensibilidad de 0.25UE/mL y para ajustarse a dicha sensibilidad del reactivo, se le aplicaron a todas las muestras el factor de la máxima dilución válida (MDV) que se expresa a continuación:

$$\frac{\text{Límite de Endotoxina Permitido de la muestra}}{\text{Sensibilidad del Lisado (UE/mL)}} = \text{Factor MDV}$$

El límite de endotoxina máximo permitido según la USP XXIII es 0.50 UE/mL para ambas muestras (solución Hartman y solución Salina); y la sensibilidad del Lisado es de 0.25 UE/mL, por lo tanto:

Para la solución Hartman:

$$\frac{0.50 \text{ UE/mL}}{0.25 \text{ UE/mL}} = 2 \quad \text{Dilución 1: 2}$$

1 mL de muestra + 1 mL de agua despirogenizada

Para la solución Salina:

$$\frac{0.50 \text{ UE/mL}}{0.25 \text{ UE/mL}} = 2 \quad \text{Dilución 1: 2}$$

1 mL de muestra + 1 mL de agua despirogenizada

Si una muestra presenta un resultado positivo, debe compararse con la curva estándar de endotoxina y como la curva detecta una concentración mínima de 0.25 UE/mL (Ver cuadro 8.1, tubo# 4) la muestra debe multiplicarse por su factor de máxima dilución válida, que para ambas muestras su valor es 2, entonces la muestra como mínimo tiene una concentración de 0.5 UE/mL o posiblemente más ya que el resultado obtenido no determina con exactitud la concentración; y como el límite permitido es no mayor que 0.5 UE/mL, solo nos interesa determinar si la muestra tiene una concentración menor o mayor al límite, para determinar si es positivo o negativo el resultado final.

Las muestras que presentaron un valor positivo de acuerdo con la curva de diluciones estándar de endotoxina, se multiplicaron por 2, según el valor del factor de la máxima dilución válida y como el resultado es igual o sobrepasa al límite (0.50 UE/mL) se toma como positivo el resultado.

$$0.25 \text{ UE/mL} \times 2 = 0.50 \text{ UE/mL.}$$

Este estudio evaluó semi-cuantitativamente si las muestras estaban por debajo del límite de endotoxinas bacterianas que permite la USP XXIII que es de 0.5 UE/mL para los parenterales en estudio. No se descarta la probabilidad de que las muestras sí tengan una concentración de endotoxinas bacterianas por debajo del límite permitido, que no cause un efecto nocivo, pero el objetivo de este estudio no fue cuantificar sino evaluar si la concentración de endotoxinas bacterianas era mayor o menor con respecto a dicho límite.

Se despirogenizó la cristalería y el material a utilizado (tijeras, pinzas, etc.) según el procedimiento indicado en la metodología. El área de trabajo se limpió completamente con alcohol Isopropílico y así mismo el resto de los materiales a utilizar (frascos de muestra, gradillas, etc.).

Se usó un mechero para garantizar que por lo menos a un pie de distancia del mismo se evitara cualquier riesgo de contaminación.

Para el ajuste de pH de las muestras, todas se encontraron en el rango, entre 6 y 8, a diferencia de 3 muestras que se repitieron para confirmar su resultado, éstas se ajustaron con NaOH 0.05N (despirogenizado). Si el pH no se hubiese encontrado en el rango podría haber interferido con la reacción L.A.L., pero se descarta dicha probabilidad ya que el pH si estuvo siempre dentro del rango.

Todas las condiciones para la realización de la prueba fueron totalmente apirógenicas para evitar una contaminación y de manera indirecta interferir con los resultados de las muestras. El baño de María se mantuvo

constante a la temperatura de $37.0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ cuando se incubaron los tubos en todas los ensayos de muestras y las personas que trabajamos dentro del área además de utilizar mascarilla , nos lavamos bien las manos con agua y alcohol, para evitar alguna contaminación.

Todos los tubos de reacción, conteniendo la endotoxina reconstituida y el reactivo L.A.L., se agitaron el tiempo indicado según el procedimiento, de manera que la formación de gel debió llevarse a cabo sin ningún problema. El tratamiento aséptico que se realizó dentro del área de trabajo rechaza la probabilidad de que las muestras hallan sido contaminadas por mal aplicación de la técnica. Efectivamente el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (L.U.C.A.M.) donde se realizó la parte experimental de este trabajo cuenta con las condiciones adecuadas para realizar la prueba utilizando L.A.L. sin ningún riesgo de contaminación.

En las muestras evaluadas del Hospital "B", no se determinó alguna muestra contaminada, o con una concentración de endotoxinas superior al límite aceptado por la USP XXIII, (0.5 UE/mL) a diferencia del Hospital "A" donde se determinó que 6 muestras de 48 analizadas (el 12.5%) si sobrepasó dicho llmite,.

Debe tomarse en cuenta que las muestras analizadas del Hospital "A", son parenterales que se fabrican en dicho Hospital. Aquí tiene mucho que ver si el personal que labora dentro de dicho laboratorio, cumple o nó con las buenas prácticas de manufactura en áreas estériles, el tipo y frecuencia de uso de los filtros que se utilizan al envasar las soluciones, el tipo y funcionamiento de los hornos o autoclaves que se utilizan para esterilizar los parenterales masivos que se producen. Así mismo verificar sí el área de trabajo cuenta realmente con las condiciones de esterilidad que se requieren para garantizar la calidad que éstos productos parenterales deben reunir, para ser productos de uso farmacéutico confiable, de administrarse a los pacientes que lo requieran.

El Hospital "B", compra directamente sus parenterales masivos a un proveedor exclusivo que elabora especialmente un lote dependiendo del consumo por dicho Hospital por períodos definidos; de manera que se facilita determinar si en algún momento dicho lote pueda estar contaminado, a diferencia del Hospital "A", donde diariamente se fabrican uno o más lotes y lo distribuyen inmediatamente a todos los servicios, ya que el consumo de dichos parenterales en dicho Hospital es aproximadamente 3 veces mayor al consumo de parenterales masivos en el Hospital "B".

De manera que la Hipótesis se acepta para el Hospital "B", y para el Hospital "A" se rechaza.

Debe tenerse un control mas estricto y eficaz en cuanto al control de calidad de producción, en el Hospital "A",

ya que de administrarsele un parenteral de este tipo a un paciente en mal estado de salud podría empeorar su cuadro clínico.

La curva de diluciones del estandar de endotoxina en la prueba, se usa para confirmar la sensibilidad del L.A.L. y preparar los controles positivos que determinan si existe o nó alguna sustancia en las muestras que interfiera con el resultado de la prueba.

10. CONCLUSIONES

10.1) En los parenterales masivos analizados del Hospital "B", no se determinó contaminación por endotoxinas bacterianas superior al límite permitido por la USP XXIII (0.5 UE/mL).

10.2) En los parenterales masivos analizados del Hospital "A", el 12.5 % de ellos, presentaron endotoxinas bacterianas, de los cuales el 8.33% y el 4.17% respectivamente corresponden a la Solución Hartman y Solución Salina.

10.3) El Lisado de Amebocitos de *Limulus* (L.A.L.) es un método eficiente, rápido y confiable para determinar endotoxinas bacterianas (pirógenos) en productos parenterales.

11. RECOMENDACIONES

11.1) Es necesario llevar un Control de Calidad de los parenterales masivos que se producen en el Hospital A, implementando el análisis de sus muestras con el método de Lisado de Amebocitos de Límulus (L.A.L.) ya que es un método eficiente para evaluar endotoxinas bacterianas.

11.2) Conservar muestras en retención para evaluar aleatoriamente la calidad de los parenterales masivos como parte del control de calidad en las Farmacias de Hospital.

11.3) Realizar un control periódico de parenterales masivos que se distribuyen en los servicios como parte de un buen sistema de Control de Calidad dentro de las Farmacias de Hospital.

12 .REFERENCIAS

- 1) The United States Pharmacopeia XXIII, Mack Publishing Easton Pa. USA, 1995.
- 2) The U.S. Pharmacopeia, National Formulary XII ed., United States Pharmacopeia Convention Inc. 1990.
- 3) Guideline on Validation and Performance of the Limulus Amebocyte Lysate Test, LAL Pyrotell Multitest Vial Associates of Cape Cod, Inc. MA USA, Apr. 1990, 4pp.
- 4) Manual L.A.L., Malinkrodt Inc., Wittaker Bioproducts, Walkersville MD USA, 1987. 30pp.
- 5) Frederick C., Pearson III, Pyrogens, "Endotoxins, LAL test and despirogenitation" Marcel Dekker, San Antonio TX, USA 1985. 272pp.
- 6) Helman, José., Farmacotécnica Teórica y Práctica, Ed. Continental, Mex 12 Tomos, Tomo 5, 1984, 503pp.
- 7) Michael J. Akers, Parenteral Quality Control" Sterility, pyrogen, particulate and package integrity testing" Marcel Dekker, NY USA 1985, 254pp.
- 8) Zimmer A.M., Spies S., Quality Control of Radiotracers, Section of Nuclear Medicine, Dept. Radiology, Northwestern University Medical Center, Chicago Ill. USA, 1984. 278pp.
- 9) Dawson M.E., Holyoke J.L., Richardson K.W., "Validation of the bacterial endotoxins test for release testing parenteral products by gel-clot, turbidimetric and cromogenic LAL methods "LAL UPDATE VI. 11, No. 1 June 1993. 8pp.

- 10) Murata H., et. al., "Sensitivity of Limulus Test and Inhibitory Factors in Radiopharmaceuticals" J. Nucl. Med. 17: 1088-1092, 1976.
- 11) Dawson M., "Endotoxin Standards and CSE Potency" LAL Update Vol 11, No.4 Sept. 1993. 5pp.
- 12) Norma COGUANOR para Guatemala, Prueba de pirógenos, método empleando conejos, Estados Unidos, Doc. Tec. No. NGO 6045 h6. 1985. 5pp.
- 13) Carrillo Reeves, L., "Estudio de los principales factores responsables de la formación de pirógenos en las soluciones inyectables". Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. (Tesis de graduación Fac. CCQQ y Farmacia) 1961. 27pp.
- 14) Morales Ruano, V.H., "Nuevas Técnicas para determinar la presencia de pirógenos en productos parenterales" Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación Fac. CCQQ y Farmacia) 1975. 43pp.
- 15) Bowman R.A., Medley A.S., Karthigasu K.T., "Limulus amoebocyte lysate assay in the diagnosis of peritonitis in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis" J. Clin. Pathol. 1992 Jan; 45(1): 72-4.
- 16) Brandtzaeg P. et. al., "Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation, and electron microscopy" J. Clin. Invest. 1992 Mar. 89 (3): 816-23.
- 17) Peer G. et. al., "Early diagnosis of gram-negative peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with the Limulus amoebocyte lysate assay" Am. J. Nephrol. 1992. 12(1-2): 19-21.

- 18) Van Den Berg C., et. al., "Delayed antibiotic induced lysis of Escherichia coli in vitro is correlated with enhancement of LPS release" Scand. J. Infect. Dis. 1992, 24 (5): 619-27.
- 19) Mazor M., et. al., "Limulus ameocyte lysate assay for diagnosing intraamniotic infection", Harefuah (Hebrew) 1992, Dec 1; 123(11): 439-43; 508.
- 20) Vanholder R., et. al., "Endotoxin transfer through dialysis membranes: small- versus large pore membranes" Nephrol. Dial. Transplant. 1992; 7 (4): 333-9.
- 21) Balint G.A., "Further analysis of ricin's effect", Exp. Toxicol. Pathol. 1993 Oct; 45(5-6): 303-4.
- 22) Nakata T., "Destruction of typical endotoxins by dry heat as determined using LAL assay and pyrogen assay" J. Parenter. Sci. Technol. 1993 Sep-Oct; 47(5):258-64
- 23) Hollander A., et. al, "inhibition and enhancement in the analysis of airborne endotoxin level in various occupational environments" Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 1993 Nov. 54 (11): 647-53.

10. ANEXOS

ANEXO # 1

CONSUMO DE PARENTERALES MASIVOS
HOSPITAL GENERAL S.J.D. Y HOSPITAL ROOSEVELT

Masivo Parenteral:	Hospital S.J.D.	Hospital Roosevelt
Hartman 1000 mL	4,646	3,139
Hartman 500 mL	450	809
Hartman 250 mL	---	423
Dextrosa 5% 1000mL	---	1,065
Dextrosa 5% 500mL	3,308	1,714
Dextrosa 5% 250mL	1,715	2,124
Dextrosa 10% 1000mL	----	141
Dextrosa 10% 500mL	293	211
Dextrosa 10% 250mL	----	365
Peridial	618	362
Mixto 1000mL	----	1,214
Mixto 500mL	5,402	391
Mixto 250mL	----	283
Salino 1000mL	3,000	3,217
Salino 500mL	4,425	1,344
Salino 250mL	2,122	1,322
Mezcla #1 500mL	117	1,068

Los datos obtenidos del Hospital Roosevelt son un promedio del consumo de 7 meses y los datos obtenidos del Hospital General San Juan de Dios son de un promedio de 3 meses de consumo.

ANEXO # 2

2.1 Fármacos seguros con agua de calidad:

La inyección intravenosa es el medio mas eficaz para la administración de agentes terapéuticos y para la reposición de fluidos orgánicos, electrolitos y nutrientes. La utilización de estos productos en medicina se realiza con seguridad gracias al alto nivel tecnológico alcanzado por la industria farmacéutica que garantiza el empleo de agua de calidad en la preparación de inyectables. Pero esto no siempre fué así. Hace años la terapia intravenosa iba seguida a menudo de fiebre alta y de otros efectos laterales peligrosos, tales como: deficiente respiración, cianosis, dolor de cabeza, sudor intenso, escalofríos, náuseas, vómitos, y otros trastornos gastrointestinales. Fué principalmente Florence Seibert quien verificó microbiológicamente el origen de los pirógenos y demostró la necesidad de utilizar agua de calidad con ausencia de los mismos, como vehículo de las drogas parenterales. Su sistema era la detección de pirógenos, la prueba de respuesta febril del conejo, (inicialmente) condujo al desarrollo de la Prueba de Pirógenos U.S.P. (4,5,6).

2.2 Desarrollo de la prueba de L.A.L.:

Loeb fué quien comunicó en 1902 por vez primera la coagulación intravenosa en el *Limulus Polyphemus*. En 1956 Bang llevó a cabo un estudio en profundidad sobre una enfermedad del "cangrejo en herradura" que terminaba con la coagulación intravascular y la muerte del animal. Pero fué en 1964 cuando Levin y Bang demostraron que la reacción de gelificación era debida a una reacción enzimática que requería la presencia de endotoxina de unas proteínas coagulables que se encontraban en los amebocitos circulantes de este cangrejo. En 1971, Cooper, Levin y Wagner publicaron los resultados de sus estudios utilizando Lisado para detectar endotoxinas en los radiofármacos. En un tiempo posterior Cooper y otros reafirman la fiabilidad de la prueba y difundieron su empleo para detectar endotoxinas en muchos productos parenterales. La gran difusión de la prueba ha llegado a despertar un gran interés incluso para endotoxinas en los diferentes fluidos orgánicos.

2.3 Bases Bioquímicas de la prueba de L.A.L.:

Levin y Bang fueron los primeros en sugerir que la reacción de gelificación del L.A.L. mediada por la endotoxina, se iniciaba por mecanismo enzimático.

Un exámen posterior del gel de amebocitos descubrió una matriz de fibras muy finas de 50-100 μ de diámetro. La especificidad por la endotoxina a concentraciones relevantes para la pirogenicidad como

activador de la enzima procoagulante de los amebocitos del Límulo fué descubierto por Yin y muchos otros investigadores. Los aspectos macroscópicos del mecanismo de gelificación del Lisado de Límulo como reacción enzimática han quedado bien establecidos.

La evidencia indica que se precisan cuatro sustancias para que se lleve a cabo la reacción de coagulación del Lisado de Límulo. Tres de ellas, la enzima procoagulante, las proteínas coagulables (coagulógenos) y los cationes divalentes (Ca^{++}) se hallan presentes en el lisado. La reacción se inicia en presencia de endotoxina (lipopolisacáridos) de bacterias gram-negativas. La temperatura óptima y los rangos de pH para la reacción in vitro son respectivamente 37-39 C y pH 6-7.5.

El mecanismo de la reacción implica la activación de la enzima procoagulante por Ca^{++} y endotoxina. Esta enzima activada cataliza el desdoblamiento del coagulógeno en subunidades de polipéptidos. La naturaleza química del coagulógeno y de sus subunidades coaguladas fué ampliamente estudiada en el *Tachypleus Tridentatus*, una especie de cangrejo en herradura encontrado en el mar de Japón que tiene la misma respuesta a la endotoxina que el Límulo. En estos estudios las subunidades decoagulógeno se denominaron cadenas A, B, C, de las cuales las cadenas A y B están interconexionadas por enlaces bisulfuros formando el coágulo. La cadena C, liberada de la porción interior de la molécula madre, no está incorporada al coágulo.

El mecanismo por el cual el coagulógeno es escindido por la enzima procoagulante se piensa que es similar al de la tripsina, hidrolasa de la serina. El Diisopropil fluorofosfato y otros inhibidores de la hidrolasa de la serina se vió que inhibían la reacción de gelificación. La escisión de la molécula madre del coagulógeno ocurre en las zonas con marcada similitud estructural al fibrinógeno de los primados y otros animales superiores.

A continuación se muestra la reacción de gelificación en forma esquemática,(4,5).

REACCION DE GELIFICACION

El complejo de enzimas es activado en presencia de Ca^{++} y endotoxinas.

Complejo + Ca^{++} + Endotoxina -----> Endotoxina + Complejo Activado

2.4 Metodología de la prueba con L.A.L.:

El L.A.L. se presenta en forma de reactivo seco para la detección in vitro de pirógenos de origen bacteriano. Se ofrece para controlar soluciones parenterales y biológicas que pueden estar contaminadas con endotoxinas. El reactivo no esta concebido para la detección de endotoxemia en el

hombre. Está hecho con un Lisado de Amebocitos circulantes del "cangrejo en herradura" *Limulus polyphemus*. El reactivo está estandarizado para determinar 0.01-0.05 ng/mL de endotoxina *E. coli* y 0.06-0.50 ng/mL de endotoxina patron USP cuando las endotoxinas respectivas se hallan suspendidas en agua estéril para inyección USP, mezcladas a partes iguales (0.1 mL a 0.1 mL) con el reactivo (Pyroteil) y dejadas incubar 60 minutos a 37 °C. (4,5).

Existen distintas metodologías de L.A.L. que están al alcance y en uso común para la detección de endotoxinas.

Entre ellas están el gel-clot, métodos cromogénicos y turbidimétricos de los cuales el gel-clot está aprobado por la U.S.P., Farmacopea Europea y otras farmacopeas internacionales.

Ambos métodos, el cromogénico y turbidimétrico, pueden usarse como punto final o de análisis cinético, son netamente cuantitativos, pero de los 3 métodos el método con gel-clot resalta por la flexibilidad y sensibilidad por presentar menos interferencia en todos los ensayos en comparación a los otros dos métodos, de manera que se asegura una interferencia mínima en la concentración del producto elaborado para la validación y evitar problemas con la rutina del examen de los lotes subsecuentes en los cuales podría haber un mayor grado de interferencia, (9).

En particular cuando se analizan radiofármacos y la formación de gel no ocurre en las pruebas de *Limulus*, se concluye con que los factores inhibitorios están contenidos en el radiofármaco, y que un resultado falso-negativo puede ocurrir en una rutina en la prueba de *Limulus*. Los factores inhibitorios pueden incluir tanto contaminantes inhibitorios o una acidez (3-5) que está fuera de rango pH favorable. En último caso la reacción inhibitoria puede ser eliminada por el ajuste apropiado de pH. En los Radiofármacos otros agentes inhibitorios incluyen sustancias tales como algunos agentes proteino-desnaturalizados, antisépticos, componentes sulfhidril y quelantes.

En análisis de Radiofármacos se ha encontrado que la sensibilidad de la prueba de *Limulus* a la endotoxina se le dá el símbolo de L, y la correspondiente sensibilidad del conejo es identificada con R, la relación L/R para varios rangos de endotoxina oscila de 1 a 10. Para *E. coli* endotoxina (0111,B) L/R = 10, lo cual significa que la prueba *Limulus* detectara 1 ng/mL mientras que la prueba del conejo requiere 10 ng/mL. Para otras endotoxinas, donde L/R puede ser menos de 10, la prueba *Limulus* puede permanecer negativa a pesar de un test del conejo positiva.

La prueba de *Limulus*, cuando es aplicable, es más simple, más rápida, más sensitiva que la prueba del conejo cuando se analizan Radiofármacos, es adaptable para el uso de medicina nuclear y laboratorios comerciales,(10).

En general las unidades se expresan en EU/mL, unidades de endotoxina por mililitro, además del método turbidimétrico y el método colorimétrico, existe el método cinético turbidimétrico automático y el método cinético colorimétrico automático, donde dichos ensayos también requieren de la elaboración de una curva de regresión estándar y el contenido de endotoxina del material en ensayo se determina por interpolación en la curva, los procedimientos incluyen la incubación durante un tiempo de reacción preseleccionado de la endotoxina y las soluciones de control con Reactivo L.A.L., y la lectura de la absorbancia espectrofotométrica a una longitud adecuada. En el caso del procedimiento turbidimétrico de punto final, la lectura se hace inmediatamente al final de cada período de incubación. En la determinación cinética (turbidimétrico y colorimétrico), la absorbancia se mide durante todo el período de reacción y los valores de velocidad se determinan a partir de estas lecturas.

El procedimiento colorimétrico la reacción se detiene, al final del tiempo preseleccionado, por la adición antes de las lecturas de una cantidad apropiada de un agente que frena la acción enzimática,(11).

2.6 Pruebas de Inhibición:

Antes de emplear la prueba LAL que determina la pirogenicidad de drogas debe demostrarse una falta de inhibición del producto o una activación de la prueba para cada formulación del medicamento. Si el medicamento está fabricado en varias concentraciones del ingrediente activo y el resto de la fórmula permanece constante, solo las concentraciones más altas o más bajas necesitan ser probadas. Si una de esas concentraciones muestra inhibición o activación, entonces debe probarse cada concentración.

La técnica de muestreo seleccionada debe dar como resultado un muestreo estadísticamente aceptable de un lote de producción terminado. Si se cambia la fuente de un ingrediente particular de la formulación de la droga, deben analizarse tres lotes de producto terminado, para determinar la presencia de inhibidores o activadores.

Para pruebas de inhibición, el producto debe ser fijado con endotoxina y diluido después con el producto, o dilución apropiada del producto, que abarque la sensibilidad del LAL.

El diluyente usado en las pruebas de dilución debe ser el mismo que el usado en las para las pruebas finales del producto. Los controles positivo y negativo deben ser incluidos. Los resultados de determinaciones de endotoxina en las series estándar y drogas no deberán diferir en más o menos una dilución doble. Los lisados son extractos crudos de limulus ameobocyte, que no han sido caracterizados en su contenido protéico, lípido, de carbohidratos o lipoprotéico. Por ello, es posible que un lisado o lote de

lisado pueda contener un componente que mediante interacción sinérgica con una formulación determinada de una droga, pueda inhibir o activar el ensayo, mientras que otro lisado o lote de lisado, sin este componente, no lo haría. Por tanto es crucial que control positivo para el producto se incluya en el protocolo de prueba de salida del producto. El control positivo para el producto podría consistir en el producto o el producto diluido, que haya sido fijado con endotoxina a una concentración de 2 veces la sensibilidad marcada del lisado, (5,7,11).

2.7 Procedimiento inicial de control de calidad para un Laboratorio que vaya a realizar la prueba:

Antes de que se realice cualquier prueba oficial, debe valorarse la variabilidad del laboratorio que realice ésta.

Deben realizarse un máximo de 8 ensayos y un mínimo de 4 por cada técnico, usando un solo lote de LAL y un solo lote de endotoxina. Para cada ensayo debe prepararse un grupo de 4 pruebas replicadas y una sola serie de diluciones de la endotoxina. Debe usarse una dilución doble seriada con unos valores adecuados para proporcionar un punto final con el LAL que se prueba. Después de la incubación, la reacción en cada tubo debe registrarse como positiva o negativa. Los puntos finales deben expresarse como EU/mL y convertirse después en logaritmos, asimismo, se debe calcular la desviación estándar (D.S.).

Si la D.S. es menor o igual que el valor para el límite del 99% sobre la D.S. para 4 muestras, la prueba está bajo control. Si la D.S. es mayor que el valor tabulado, el ensayo debe ampliarse a un máximo de 8 pruebas. Si después de las 8 pruebas la D.S. excede del valor del 99% del límite superior correspondiente a las 8 pruebas, los ensayos no son válidos por variabilidad excesiva. Si después de cualquier batería de 4 replicados la D.S. es igual o menor que el valor tabulado para ese número de pruebas, puede concluirse que la variabilidad está bajo control y no son necesarios más ensayos. En este punto, debe calcularse la media geométrica (M.G.) de los puntos finales obtenidos en todos los ensayos. Si el valor marcado para el lisado empleado cae dentro de mas/menos una dilución doble de la media geométrica, las pruebas han confirmado el valor marcado en la etiqueta. Si no es así, entonces debe determinarse la fuente de variación antes de realizar pruebas adicionales, (7,11).

ANEXO # 3

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO UTILIZANDO LAL LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

El procedimiento está limitado por la capacidad de la muestra de inhibir o realizar la prueba LAL. Si el procedimiento no puede ser validado en una concentración de la muestra que es mayor que la concentración mínima válida (CMV), entonces la prueba LAL no puede ser sustituida por la Prueba USP de Pirógenos. La CMV se calcula como sigue: (λ) (dosis de la muestra/Límite de Endotoxina) donde λ está en EU/mL, la dosis de la muestra está en unidades por kg del peso corporal, y el límite de tolerancia de endotoxina está en EU/kg. La dilución máxima válida (DMV) es la dilución de muestra que contiene el CMV. Es la concentración inicial de muestra dividido entre el CMV.

El límite de tolerancia de la endotoxina es 0.2 EU/kg para drogas con una ruta de administración intratecal y 5 EU/kg para todos los otros parenterales. El límite para equipo médico se expresa por mL de una extracción o volumen de lavado obtenido como se describe en la guía de la F.D.A. Para equipo que contacta el fluido cerebroespinal, el límite es 0.06 EU/mL; para aquellos que no lo hacen, es de 0.5 EU/mL. El límite para equipos de líquidos es el mismo que para las drogas. La tripsina causa un resultado falso positivo a menos que desnaturalice por tratamiento con calor antes del análisis. Los materiales como sangre, suero, y plasma deben ser tratados para inactivar los inhibidores antes de ser analizados, (1,3).

ANEXO # 4

EJEMPLO DE UNA PRUEBA DE LIMITES

(PASA/FALLA)

EJEMPLO DE UNA PRUEBA DE LIMITES (PASA/FALLA). Si es posible analizar una concentración de muestra con una sensibilidad dada del Pyrotell® (LAL) y que el resultado indique si la muestra de prueba tiene o no más o menos endotoxina que su límite. En este ejemplo, la concentración de muestra es 1 mg/mL y el límite deseado o pre-determinado de endotoxina para la muestra es 3 EU/mg (ver "limitaciones del Procedimiento" Anexo # 3). El límite expresado en EU/mL,

$$(3 \text{ EU/mg}) / (1 \text{ mg/mL}) = 3 \text{ EU/mL},$$

es mayor que la sensibilidad del Pyrotell® (LAL), 0.25 EU/mL, así que la muestra debe ser diluida para realizar una prueba pasa/falla. Determine la dilución de la muestra que indicará el límite de endotoxina en EU/ml por medio de la sensibilidad del LAL:

$$3 \text{ EU/mL} / 0.25 \text{ EU/mL} = 12.$$

Combine una parte de la muestra con 11 partes de agua despirogenizada para lograr la dilución 1:12 y analice. El resultado indicará si la muestra pasa la prueba en el límite de 3 EU/mL. Los controles del producto positivos son incluidos en la dilución de la muestra para descartar resultados falso negativos. (3).

ANEXO # 5
 EJEMPLO DE UN ENSAYO DEL
 ANALISIS DE UNA MUESTRA
 PARA CUANTIFICAR ENDOTOXINAS BACTERINAS

La endotoxina es cuantificada en un ensayo por medio del hallazgo del punto final en una serie de diluciones de una muestra. En el ejemplo de abajo, la muestra se diluye con agua despirogenizada y las diluciones en la tabla se analizan; El límite de endotoxina es 0.25 EU/mL. Los resultados se colocan como positivos o negativos.

Dilución de la Muestra	Resultados de la Prueba
no diluida	+
1:2	+
1:4	+
1:8	-
1:16	-
1:32	-
control negativo	-

Para calcular la concentración de endotoxina en la muestra, multiplique la sensibilidad del Pyrotell (λ) por el recíproco de la dilución en el punto final:

$$\text{Conc.} = (\lambda)(4/1) = (0.25 \text{ EU/mL})(4) = 1 \text{ EU/mL.}$$

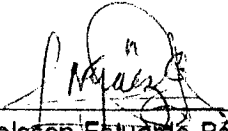
La concentración para ensayos replicados es expresada como la media geométrica.

Un control positivo del producto (la muestra puesta con endotoxina standard en la dilución #2) debe estar presente y dar positivo para descartar resultados falso negativos. Si el control positivo del producto es negativo, la muestra está interfiriendo (inhibiendo) con la prueba LAL. La muestra debe ser reanalizada a una dilución mayor (no que exceda el MVD; ver "Limitaciones del Procedimiento").(Anexo # 3), (3).

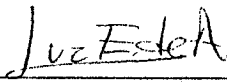
ANEXO # 6

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

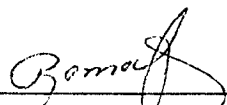
El Pyrotell® (LAL) congelado-seco es relativamente estable al calor y si se guarda en refrigeración, retendrá su actividad completa a través de la fecha de expiración sobre la etiqueta en el vial. Guarde el producto a -20 hasta +8°C. Las temperaturas menores de -20°C encogen el tapón, llevando a una pérdida del vacío y una posible contaminación del Pyrotell®. Las temperaturas mayores de 37°C pueden causar un rápido deterioro del Pyrotell® liofilizado evidenciado por una pérdida en la sensibilidad y un color amarillento distintivo del producto. El Pyrotell® es embarcado en paquetes fríos en contenedores aislados para protegerlo de las altas temperaturas. El Pyrotell® reconstituido es generalmente claro y un poco opalescente. Un lote ocasional exhibirá una turbidez leve, uniforme. La presencia de pequeñas fibras o hebras no indica contaminación ni afectan su actividad; sin embargo, una precipitación floculente o un color amarillo distintivo sí indican deterioro. El Pyrotell® reconstituido es menos estable que el producto congelado-seco; los viales pueden ser manejados hasta por 24 horas de 2 a 8 °C. El Pyrotell® reconstituido puede ser congelado una vez. El producto retendrá su actividad por tres meses si se congela inmediatamente después de la reconstitución y llevado a -20°C. Después de deshielarse, se aplica el mismo criterio visual usado al inicio de la reconstitución de la calidad. (3,6).



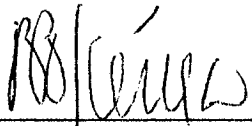
Dr. Nelson Estuardo Pérez Gonzalez
Autor



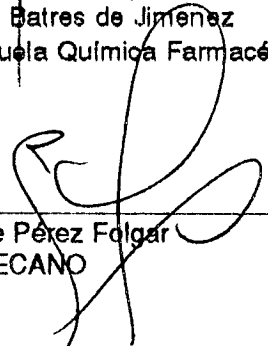
Licda. Luz Emilia Roldán de Alvarez
Asesora



Licda. Raquel Pérez Obregón
Co-Asesora



Licda. Beatriz Batres de Jiménez
Directora Escuela Química Farmacéutica



Lic. Jorge Pérez Folgar
DECANO