

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**" VALIDACION DE LA PRUEBA DE LISADO DE AMEBOCITO
DE LIMULUS (LAL) PARA LA DETECCION DE
ENDOTOXINAS BACTERIANAS EN SOLUCIONES
PARENTERALES**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTAN:

**AGUSTIN GONZALEZ SANCHEZ
ENRIQUE GUTIERREZ SILVA**

DIRECTOR DE TESIS:

MVZ AGUSTIN RAMIREZ ALVAREZ

Zapopan, Jal. Agosto 1994

Cuando logramos alcanzar la meta en la cual enfocamos todos nuestros esfuerzos, la dicha que obtenemos borra momentáneamente los obstáculos que se tuvieron que salvar.

Pero al volvernos a mirar el camino recorrido nos damos cuenta de que no lo haríamos posible sin el apoyo y aliento que nos brindaron nuestros seres queridos.

Nuestro eterno agradecimiento a estas personas que nos dieron esa fuerza cuando mas lo necesitamos.

Agustín

Enrique

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	i
INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
JUSTIFICACION	7
HIPOTESIS	8
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	11
DISCUSION	13
CONCLUSIONES	14
ANEXO 1: METODOLOGIA PARA LA VALIDACION DE LA PRUEBA DE LAL SEGUN "FOOD AND DRUG - ADMINISTRATION"	15
ANEXO 2: METODOLOGIA PRUEBA DE LAL	16
ANEXO 3: METODOLOGIA PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJOS	18
BIBLIOGRAFIA	21

RESUMEN

La administración de fármacos parenterales a pacientes, inadvertidamente contaminados con pirógenos pueden inducir muchas respuestas biológicas; así la reacción pirogénica puede manifestarse en forma de fiebre elevada, migración de linfocitos, fijación de complemento, 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 la cantidad de pirogenos inyectados.

Los pirogenos que preocupan a la industria farmacéutica, preparadora de soluciones parenterales son las endotoxinas, ya que si bien las endotoxinas no son los únicos agentes pirogénicos, se ha comprobado que los pirogenos mas importantes en fármacos inyectables son de procedencia bacteriana(endotoxinas).

En el presente trabajo se realizó la Validación de la prueba de Lisado de Amebocito de limulus (LAL) para la detección de Endotoxinas Bacterianas en cuatro tipos de soluciones parenterales de gran volumen elaborados por la Industria Farmacéutico Mexicana, para sustituir la prueba de pirógenos en conejos. Se evaluaron por el método de pirogenos en conejos (FEUM V (12)), y por el método LAL (FDA (5)), tres lotes de línea de cada presentación de los cuatro productos validados, sin agregar y agregando diferentes cantidades de endotoxina.

Se comprobó que los pirógenos (endotoxinas bacterianas) son detectadas con mayor precisión y menor variabilidad por la prueba de LAL que por la prueba de pirógenos en conejos, además se demostró que no existe interferencia de estos productos validados a la prueba de lisado de amebocito de Limulus, no presentando inhibición o potencialización a la reacción de gelación de la prueba por lo que representa un método alternativo más rápido y seguro que la determinación en conejos para la detección de pirógenos (endotoxinas bacterianas).

INTRODUCCION

Actualmente dentro de las pruebas de Control de Calidad que aplica la Industria Farmacéutica para verificar los fármacos inyectables que produce se encuentra la Prueba de Pirógenos en conejos.

A las sustancias que producen fiebre se les denomina PIROGENOS. La palabra pirógenos proviene del griego "pyro" que significa calentamiento o fuego, lo cual describe sustancias que producen elevación de temperatura corporal (6,11).

La naturaleza de los pirógenos se comprendió al saberse que la contaminación pirogénica está asociada con la existencia de enterobacterias, algunas conocidas también como gram negativas.

El componente pirogénico de estos organismos es la endotoxina, complejo de lipopolisacárido que se encuentra en la capa más externa de la pared celular. El término "Pirógeno" se empleó para describir este contaminante porque el principal y más patético 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 (6,10).

La administración de drogas parenterales inadvertidamente contaminadas con endotoxinas, pueden inducir muchas respuestas biológicas; así, la reacción pirogénica puede manifestarse en forma de fiebre elevada, migración de linfocitos, fijación de complemento, liberación de histamina y alteración de 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 producir en el hombre una respuesta febril (6,11).

Los pirógenos han sido divididos en dos clases:

- a) Pirógenos Exógenos
- b) Pirógenos Endógenos

a) PIROGENOS EXOGENOS

Son aquellas sustancias originadas fuera del organismo, las cuales al ser inyectadas en animales y humanos producen elevación de temperatura. Aunque los lipopolisacáridos (Endotoxinas) son de hecho los más importantes pirógenos exógenos, existen otra gran diversidad de químicos que pueden causar elevación de temperatura cuando son inyectados en circunstancias apropiadas.

Algunas clases generales de pirógenos exógenos incluyen microbios (componentes microbianos de bacterias gram negativas, bacterias gram positivas, hongos), así como pirógenos no microbianos tales como algunas drogas esteroides, fracciones del plasma y el adyuvante sintético muramil dipéptido (6).

b) PIROGENOS ENDOGENOS

Son sustancias homogéneas sintetizadas por varias células del huésped después de la exposición a pirógenos exógenos como pueden ser las endotoxinas.

Si bien las endotoxinas no son los únicos agentes pirogénicos, las Endotoxinas son los pirógenos que preocupan a la industria farmacéutica preparadora de soluciones parenterales (6).

Las otras fuentes de pirogenicidad (contaminación química o por partículas) pueden ser controladas siguiendo 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 medios normales de filtración. Lo más importante: La endotoxina es ubicua en la naturaleza por lo que las superficies y aguas no tratadas deben considerarse en principio como pirogénicas.

Las bacterias gram negativas crecerán en las soluciones con un mínimo de nutrientes, tales como el agua almacenada después de la esterilización y desionización. Generalmente es antieconómico y en ocasiones prácticamente imposible eliminar la contaminación pirogénica una vez que se encuentra presente en una forma farmacéutica. 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 (10).

La inyección intravenosa es el medio más eficaz para la administración de agentes terapéuticos y para la reposición de fluidos orgánicos, electrolitos y nutrientes. La gran 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 máxima calidad en la preparación de inyectables.

Pero esto no fue siempre así, hace años la terapia intravenosa venia seguida a menudo de fiebre alta y de otros efectos colaterales peligrosos.

El desarrollo de productos parenterales seguros tuvo lugar hace unos 60 años cuando unos científicos descubrieron la naturaleza y origen de la pirogenicidad responsables de las reacciones febriles. Fue principalmente Florence Seibert quien verificó microbiológicamente el origen de los pirógenos y demostró la necesidad de utilizar agua de gran calidad como vehículo de las drogas parenterales. Su sistema para la detección de pirógenos, la prueba de respuesta febril del conejo, condujo al desarrollo de la prueba de pirógenos USP (4).

Algunas de las pruebas utilizadas para la detección de Pirógenos son las siguientes:

A) PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJOS

Al reconocer la necesidad de un método confiable para determinar la contaminación pirogénica, la farmacopea de los Estados Unidos introdujo la prueba de pirógenos en 1942. Los criterios para la prueba se basaron en un estudio conjunto realizado por la industria y por el gobierno sobre el efecto en los conejos de una endotoxina de *Pseudomonas*.

La prueba ha demostrado ser eficaz; no obstante, tiene sus desventajas y limitaciones. La prueba de pirógenos USP es cara y consume mucho tiempo a la vez que requiere espacio, instalaciones y personal entrenado. Una limitación seria es la variación biológica de los conejos. Por ejemplo hay variación de una raza a otra en cuanto a sensibilidad a los pirógenos y algunas colonias de conejos llegan a hacerse tolerantes a niveles bajos de pirógenos. Por estas variaciones pueden darse resultados falsos negativos o falsos positivos (2,3,4,6,12,13).

B) PRUEBA DE LIMULUS

Una de las alternativas que se han propuesto y estudiado para detectar pirógenos es la prueba de *Limulus*, la cual representa un gran avance en la detección de los mismos. Esta nueva prueba in vitro permite la simplificación de la prueba de pirógenos en conejos con mayor efectividad y fiabilidad.

Loeb fue 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 herradura" que terminaba con la coagulación intravascular y la muerte del animal. Pero fue en 1964 cuando Levin y Bang demostraron que la etiología de esta enfermedad era debida a la endotoxina.

En 1968 Levin y Bang demostraron que la reacción de gelificación era debida a una reacción enzimática que requería la presencia de endotoxina y 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 confiabilidad 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 detectar endotoxinas en los diferentes fluidos orgánicos (1,3,8,10).

Por otro lado las tendencias mundiales en cuanto a las pruebas en animales son las siguientes:

ESTADOS UNIDOS: En 1990 las resoluciones de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos sobre las pruebas en animales fue la siguiente: "La Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos esta trabajando en refinar, reemplazar y reducir la cantidad de pruebas que requieren el uso de animales tan rápidamente como la ciencia y la tecnología lo permitan"

La siguiente es una recomendación de la Conferencia abierta de la USP en relación a los métodos alternativos de pruebas de toxicidad y opciones in vitro; reemplazar rápidamente todas las pruebas de pirógenos por prueba de ENDOTOXINAS BACTERIANAS (9).

INGLATERRA Y EUROPA: La Comisión de la farmacopea Británica y la Comisión de la farmacopea Europea están buscando donde fuese posible una reducción en el uso de animales para pruebas farmacopeicas.

El remover una prueba "in vivo" se puede efectuar tan solo cuando tal remoción sea consistente con la obtención de resultados estándares farmacopeicos satisfactorios, esto es, cuando la calidad del material pueda ser controlada adecuadamente por medio de una prueba "in vitro".

En suma, los ensayos biológicos han sido omitidos de ciertas preparaciones donde actualmente son desarrollados por métodos fisicoquímicos satisfactorios (2,4).

En el Reino Unido se introdujo el concepto de las 3 R: Reducir Refinar, y Reemplazar. Por medio de varias estrategias pueden lograrse estos principios.

En la ultima década se han difundido los métodos "alternativos" los que, si bien no logran eliminar completamente a los animales de una investigación, por lo menos reducen mucho su numero (reemplazar) y también su costo.

Las áreas de investigación y de control de calidad en que las alternativas han comprobado su utilidad son: control de toxicidad, propiedades mutagénicas, etiología y tratamiento de neoplasias, control de medicamentos, producción de vacunas, investigación en biología molecular y celular (7).

Aunque no es un factor primario en el desarrollo de un programa de alternativas para las pruebas de animales, lo económico de las alternativas a las pruebas de animales no debe ser perdido de vista. Las pruebas en animales son caras y se están volviendo mas costosas debido a las nuevas reglas y regulaciones que rigen la venta, facilidades, mantenimiento y tratamiento de animales usados para prueba (9).

El uso de una prueba biológica "in vitro", aunque requieren técnicas especializadas, facilidades y técnicos, requiere de un costo mas bajo por prueba que las pruebas desarrolladas en animales. Como punto de referencia podemos tomar en consideración los datos reportados por la farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (9):

PRUEBA	COSTO APROXIMADO (dolares)
Prueba de Pirógenos en conejos	30-35
Endotoxinas Bacterianas (LAL)	1.50

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las pruebas de Pirógenos en conejos es un método confiable y eficaz para determinar contaminación pirogénica en productos inyectables. Sin embargo presenta desventajas y limitaciones como son el que requiere de bastantes animales reactivo (conejos), de espacio destinado para alojamiento de animales, materiales y almacenamiento de víveres, esto unido a las necesidades de mano de obra y personal analítico especializado y a las limitaciones debidas a las variaciones biológicas de los conejos (raza, sensibilidad, estado de salud, etc.) hacen de la prueba de pirógenos en conejo una prueba cara y que consume mucho tiempo (5,9).

En varios países se está trabajando actualmente con la prueba de lisado de amebocito de Limulus (LAL) en lugar de la prueba de pirógenos en conejo, ya que este método ha demostrado representar un menor costo por prueba, requerir de menor espacio destinado para área de análisis y tener una mayor sensibilidad para detectar pirógenos. Aunque también requiere de personal capacitado, este es en menor número que el necesario para desarrollar la prueba de pirógenos en conejos (2,3,4,6,10,11).

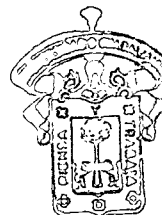
JUSTIFICACION

Dentro de los problemas que presenta el cambiar una técnica de análisis está el de asegurar que el reemplazo, en este caso una prueba "in vivo" por una alternativa "in vitro" no conduzca a una pérdida de información en cuanto a la característica de calidad óptima del producto, objetivo común de toda industria farmacéutica, esto quiere decir que el método alternativo debe ser igual o más sensible que el método a reemplazar, de lo contrario se tendría repercusión en la calidad de los medicamentos administrados en pacientes (9).

Actualmente toda industria farmacéutica requiere de la validación de sus métodos analíticos debido a dos razones fundamentales:

1. Para comprobar y verificar que los métodos analíticos empleados son confiables y efectivos.
2. Para asegurar que estos se ajusten a las normativas compuestas por los organismos oficiales.

En el caso de la prueba de LAL aunque ya es utilizada en varios países previa validación, requiere que antes de su utilización en México demuestre su confiabilidad por medio de la validación que descarte posible interferencia en su efectividad debido a materiales y procedimientos de fabricación utilizados en México (5,12,13).



BIBLIOTECA CENTRAL

HIPOTESIS

La detección de endotoxinas bacterianas por medio del lisado de amebocito se basa en la reacción de una enzima procoagulante unida a una apropiada concentración de cationes divalentes (generalmente Ca^{++} y/o Mg^{++}) con la endotoxina produciendo una enzima coagulante que actúa sobre otro componente, el coagulógeno, el cual al ser roto se vuelve insoluble y forma un coágulo.

Es factible que en México esta prueba tenga los mismos resultados que los reportados en otros países bajo las condiciones de fabricación de México.

OBJETIVOS

GENERAL

Validar la prueba para detección de Endotoxinas Bacterianas (Pirógenos) de acuerdo a los procedimientos descritos en la "Norma para la validación de la prueba de Lisado de Amebocito de Limulus como una prueba para la detección de Endotoxinas en producto terminado de fármacos parenterales de uso humano y animal, productos biológicos y equipos médicos" editada por FDA (Food and Drug Administration). Ver ANEXO 1 (5)

PARTICULARES

1. Evaluar las condiciones de libertad de pirógenos en los siguientes productos:

Solución de Glucosa al 5% (250, 500 y 1000 ml)
Solución de Cloruro de Sodio al 0.9% (250, 500 y 1000 ml)
Solución Hartman (500 y 1000 ml)
Agua Inyectable (500 y 1000 ml)

2. Comparar la determinación de Endotoxinas Bacterianas mediante la prueba de Lisado de Amebocito de Limulus (LAL) con la prueba de pirógenos en conejos.

MATERIAL Y METODOS

Se evaluaron tres lotes de línea de cada uno de los productos a validar de acuerdo a los programas de producción de la industria farmacéutica seleccionada lo cual representó un período de 4 meses aproximadamente.

A dichos lotes se les aplicaron en forma paralela las siguientes pruebas:

A) Prueba de pirógenos en conejos utilizando la metodología indicada en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) (12,13). Ver ANEXO 3. Así mismo se corrió esta prueba en productos a los que se les añadió cantidades conocidas de endotoxinas en la misma concentración que la utilizada en las Pruebas de Inhibición y Potencialización de LAL (descritas en el inciso B).

B) Prueba de LAL: Una vez que los productos pasaron las pruebas de inhibición o potencialización a la respuesta de gelificación, se procedió a efectuar pruebas de LAL de acuerdo a la metodología descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) (13). Ver ANEXO 2.

Las pruebas de Inhibición o Potencialización se efectuaron para descartar posibles interferencias debido a los componentes de la formulación respectiva de los productos a probar, se agregaron cantidades conocidas de Endotoxinas en una concentración menor a los límites permitidos por FDA para evaluar probables reacciones de potencialización y en una concentración mayor a estos límites para evaluar si existiera inhibición a la respuesta de gelificación del reactivo, dando resultados falsos positivos o negativos. Se evaluaron cada uno de los 3 lotes de los productos de línea de la Industria Farmacéutica seleccionada siguiendo la metodología descrita por FDA (5). Ver ANEXO 1.

A fin de que los analistas fueran aceptados para correr las pruebas de LAL se llevaron a cabo las pruebas necesarias para aprobarlos, esto significa que se evaluó la variabilidad entre los resultados de diferentes pruebas desarrolladas por cada uno de ellos siguiendo la metodología y considerando los parámetros de aceptación descritos por FDA (Ver ANEXO 1) (5).

Las conclusiones para cada producto se dictaminaron con base en los resultados evaluados mediante un estudio de correlación: respuesta concentración de ambos métodos y análisis de varianza.

RESULTADOS

A) PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJOS

En las tablas 3 a la 6 se pueden observar los resultados en grupos de tres conejos cada uno (que es la prueba oficial de FEUM V) inyectando los productos agregando y sin agregar endotoxinas.

Los productos analizados sin agregar endotoxinas presentaron resultados satisfactorios reportando todos los resultados negativos a la presencia de endotoxinas.

En los productos a los que se agregó endotoxinas se observó una variación muy alta por grupo (Tabla 1) ya que en los grupos en los que se inyectó 2 lambdas (una lambda es la mínima cantidad requerida de endotoxinas para provocar un aumento de 0.6 grados centígrados la temperatura corporal en conejos y humanos), un 10% de estos grupos pasó la prueba de pirógenos.

En los grupos inyectados con 1 lambda el 40% reporta resultados negativos a pirógenos (aunque dudosos para pruebas normales de rutina lo que representaría una repetición de prueba).

En lo grupos inyectados con 0.5 lambda el 80% reporta resultados negativos.

B) PRUEBA DE LAL

PRUEBA DE ACEPTACION DE ANALISTAS: Los resultados obtenidos en las pruebas para aceptar los analistas fueron satisfactorios ya que las variaciones entre los resultados de las 4 pruebas por analista estuvieron dentro de las normas solicitadas por FDA para esta prueba (Reportes 1 y 2).

PRUEBA DE INHIBICION Y POTENCIALIZACION: No se encontró en ninguno de los productos muestreados resultados positivos en concentraciones más bajas de 0.5 lambdas (una lambda es la cantidad de endotoxina equivalente a la sensibilidad etiquetada del reactivo LAL), ni resultados negativos en concentraciones más altas de 2.0 lambdas, por lo que se determina que pasan la prueba de inhibición y potencialización (Reportes 3 a la 6).

PRUEBA DE LAL: Las pruebas de LAL en los productos que no se agregó endotoxinas (Ver controles negativos en tablas 3 a la 6) presentaron resultados satisfactorios cumpliendo los requerimientos de prueba como libres de endotoxinas.

La tabla dos muestra los resultados comparativos de las desviaciones estándar por producto utilizando el método de LAL y Pirogenos.

TABLA 1

Resultados positivos en 30 pruebas LAL y conejos corrido en paralelo por cada nivel de endotoxinas.

Concentración de endotoxinas en lambdas	Conejos		LAL	
	+ Grupos	Porcentaje	+ Pruebas	Porcentaje
2	27	90	30	100
1	18	60	30	100
0.5	6	20	19	63
0.25	-	-	0	0
Controles Negativos	0	0	0	0

1 lambda en conejo = 0.5 Unidades de Endotoxina/ml

1 lambda LAL = 0.125 Unidades de Endotoxina/ml

TABLA 2

Promedio de desviaciones estandar relativas por producto en cada prueba.

PRODUCTO	DER CONEJOS	DER LAL
Solucion glucosada al 5%	39.35%	37.58%
Solucion de ClNa al 0.9%	45.28%	44.02%
Solucion Hartman	38.95%	49.17%
Agua inyectable	79.95%	41.32%

DER= Desviacion Estandar Relativa

Los promedios de las desviaciones estandares relativas para la prueba de pirogenos, se determinaron a partir de las desviaciones estandares de la elevacion de la temperatura de cada conejo, por concentracion de endotoxinas inyectadas.

Los promedios de las desviaciones estandares relativas para la prueba de LAL se obtuvieron de la desviacion estandar relativa determinada de los resultados de gelacion en cada serie por las unidades de endotoxina inoculada.

TABLA 3

SOLUCION DE GLUCOSA AL 5 % RESULTADOS DE PRUEBAS DE PIROGENOS EN CONEJOS Y RESULTADOS DE PRUEBAS DE LISADO DE AMEBOCITO

Concentración de Endotoxinas en lambdas	CONEJOS (9 Grupos por concentración)				L A L (9 Series por concentración)			
	Grupos +	Porcentaje	Grupos --	Porcentaje	Pruebas +	Porcentaje	Pruebas --	Porcentaje
2	8	88,8	1	11,1	9	100	0	0
1	6	66,6	3	33,3	9	100	0	0
0,5	1	11,1	8	88,8	5	55,5	4	44,5
Controles Negativos	0	0	0	0	0	0	0	0

1 lambda en conejos = 0.5 Unidades de endotoxina /ml

1 lambda LAL = 0.125 Unidades de Endotoxina/ml

TABLA 4

SOLUCION DE C₁₂H₂₂O₁₁ AL 0.9 % RESULTADOS DE PRUEBAS DE PIROGENOS EN CONEJOS Y RESULTADOS DE PRUEBAS DE LISADO DE AMEBOCITO

Concentración de Endotoxinas en lambdas	CONEJOS (9 Grupos por concentración)				L A L (9 Series por concentración)			
	Grupos +	Porcentaje	Grupos --	Porcentaje	Pruebas +	Porcentaje	Pruebas --	Porcentaje
2	8	88,8	1	11,1	9	100	0	0
1	5	55,5	4	44,5	9	100	0	0
0,5	2	22,2	6	66,6	5	55,5	4	44,5
Controles Negativos	0	0	0	0	0	0	0	0

1 lambda en conejos = 0.5 Unidades de endotoxina /ml

1 lambda LAL = 0.125 Unidades de Endotoxina/ml

TABLA 5

SOLUCION HARTMAN RESULTADOS DE PRUEBAS DE PIROGENOS EN CONEJOS Y RESULTADOS DE PRUEBAS DE LISADO DE AMEBOCITO

Concentración de Endotoxinas en lambdas	CONEJOS (6 Grupos por concentración)				L A L (6 Series por concentración)			
	Grupos +	Porcentaje	Grupos --	Porcentaje	Pruebas +	Porcentaje	Pruebas --	Porcentaje
2	6	100	0	0	6	100	0	0
1	5	83,3	1	16,7	6	100	0	0
0,5	2	33,3	4	66,7	6	100	0	0
Controles Negativos	0	0	0	0	0	0	0	0

1 lambda en conejos = 0.5 Unidades de endotoxina /ml

1 lambda LAL = 0.125 Unidades de Endotoxina/ml

TABLA 6

AGUA INYECTABLE RESULTADOS DE PRUEBAS DE PIROGENOS EN CONEJOS Y RESULTADOS DE PRUEBAS DE LISADO DE AMEBOCITO

Concentración de Endotoxinas en lambdas	CONEJOS (6 Grupos por concentración)				L A L (6 Series por concentración)			
	Grupos +	Porcentaje	Grupos --	Porcentaje	Pruebas +	Porcentaje	Pruebas --	Porcentaje
2	6	100	0	0	6	100	0	0
1	2	33,3	4	66,7	6	100	0	0
0,5	1	16,7	5	83,3	3	50	3	50
Controles Negativos	0	0	0	0	0	0	0	0

1 lambda en conejos = 0.5 Unidades de endotoxina /ml

1 lambda LAL = 0.125 Unidades de Endotoxina/ml

PRUEBA DE CONFIRMACION DE SENSIBILIDAD DE LISADO (LAL)

Reporte: 1

LISADO LOTE: 21-30-562		MARCA: PIROTELL	
CADUCIDAD 10/05/96		SENSIBILIDAD: 0.125 UE/ml	
ENDOTOXINA LOTE: 55	CONCENTRACION: 5000 UE/VIAL	CADUCIDAD: 26/02/97	MARCA: PIROTELL
AGUA LOTE (LWR): 3L1480	VOLUMEN: 30 ml	CADUCIDAD: 16/02/95	MARCA: ENDOSAFE

DILUCIONES DEL ESTANDAR

- a) Adicionar al vial de endotoxina (5000 UE) 5 ml de LWR y agitar en vortex durante 30 min.
- b) Tomar del vial (dilucion A) 100 mcl y aforar a 10 ml con LWR concentracion final 10 UE/ml
- c) Tomar de " b " 1 ml (10 UE) aforar a 10 ml con LWR concentracion final 1 UE/ml
- d) Tomar de " c " 1 ml (1 UE) agregar 1 ml de LWR concentracion final 0.5 UE/ml
- e) Tomar de " d " 1 ml (0.5 UE) agregar 1 ml de LWR concentracion final 0.25 UE/ml
- f) Tomar de " e " 1 ml (0.25 UE) agregar 1 ml de LWR concentracion final 0.125 UE/ml
- g) Tomar de " f " 1 ml (0.125 UE) agregar 1 ml de LWR concentracion final 0.0625 UE/ml
- h) Tomar de " g " 1 ml (0.0625 UE) agregar 1 ml de LWR concentracion final 0.03125 UE/ml

NOTA : Agitar cada dilución (c,d,e,f,g,h) durante 5 min. en Vortex.

FECHA : 19/Octubre/93		FECHA : 21/Octubre/93		FECHA : 26/Octubre/93	
PUNTO FINAL(EU/m)	LOGARITMO PUNTO FINAL	PUNTO FINAL(EU/m)	LOGARITMO PUNTO FINAL	PUNTO FINAL(EU/ml)	LOGARITMO PUNTO FINAL
0,06	-1,221849	0,12	-0,920819	0,12	-0,92082
0,12	-0,920819	0,12	-0,920819	0,06	-1,22185
0,06	-1,221849	0,12	-0,920819	0,06	-1,22185
0,12	-0,920819	0,12	-0,920819	0,06	-1,22185
PROMEDIO P. FINALES	-1,071334	PROMEDIO P. FINALES	-0,920819	PROMEDIO P. FINALES	-1,14659
ANTILOG PROMEDIO	0,08	ANTILOG PROMEDIO	0,12	ANTILOG PROMEDIO	0,07

Se acepta una variacion de la mitad (0.5) o dos veces (2) la sencibilidad () etiquetada del reactivo

FECHA : 28/Octubre/93		PRUEBA DE ACEPTACION DE ANALISTA EVALUACION DE LA VARIABILIDAD DE RESULTADOS POR ANALISTA			
PUNTO FINAL(EU/m)	LOGARITMO PUNTO FINAL	PRUEBA	SENSIBILIDAD DETECTADA	PROM.	
0,06	-1,221849				
0,12	-0,920819				
0,12	-0,920819				
0,25	-0,60206				
PROMEDIO P. FINALES	-0,916387				
ANTILOG PROMEDIO	0,12				
			Fecha	Resultado	
		1ª Prueba	19/oct./93	0,08	0,10
		2ª Prueba	21/oct./93	0,12	DES. EST
		3ª Prueba	26/oct./93	0,07	
		4ª Prueba	28/oct./93	0,12	0,02

DICTAMEN: PASA PRUEBA Variacion aceptable dentro de .25 a 0.5 UE/ml	ANALIZO: AGUSTIN GONZALEZ S.	FECHA		
		28	Octubre	1993

LAL: 1 LAMBDA = CONCENTRACION DE ENDOTOXINAS EXPRESADA EN LA SENSIBILIDAD ETIQUETADA DEL REACTIVO LAL

PRUEBA DE CONFIRMACION DE SENSIBILIDAD DE LISADO (LAL)

Reporte: 2

LISADO LOTE: 21-30-562		MARCA: PIROTELL	
CADUCIDAD 10/05/96		SENSIBILIDAD: 0.125 UE/ml	
ENDOTOXINA LOTE: 55	CONCENTRACION: 5000 UE/VIAL	CADUCIDAD: 26/02/97	MARCA: PIROTELL
AGUA LOTE (LWR): 3L1480	VOLUMEN: 30 ml	CADUCIDAD: 16/02/95	MARCA: ENDOSAFE

DILUCIONES DEL ESTANDAR	
a) Adicionar al vial de endotoxina (5000 UE) 5 ml de LWR y agitar en vortex durante 30 min.	
b) Tomar del vial (dilucion A) 100 mcl y aforar a 10 ml con LWR concentracion final 10 UE/ml	
c) Tomar de " b " 1 ml (10 UE) aforar a 10 ml con LWR concentracion final 1 UE/ml	
d) Tomar de " c " 1 ml (1 UE) agregar 1 ml de LWR concentracion final 0.5 UE/ml	
e) Tomar de " d " 1 ml (0.5 UE) agregar 1 ml de LWR concentracion final 0.25 UE/ml	
f) Tomar de " e " 1 ml (0.25 UE) agregar 1 ml de LWR concentracion final 0.125 UE/ml	
g) Tomar de " f " 1 ml (0.125 UE) agregar 1 ml de LWR concentracion final 0.0625 UE/ml	
h) Tomar de " g " 1 ml (0.0625 UE) agregar 1 ml de LWR concentracion final 0.03125 UE/ml	
NOTA : Agitar cada dilución (c,d,e,f,g,h) durante 5 min. en Vortex.	

FECHA : 19/Octubre/93		FECHA : 21/Octubre/93		FECHA : 26/Octubre/93	
PUNTO FINAL(EU/ml)	LOGARITMO PUNTO FINAL	PUNTO FINAL(EU/ml)	LOGARITMO PUNTO FINAL	PUNTO FINAL(EU/ml)	LOGARITMO PUNTO FINAL
0,06	-1,221849	0,12	-0,920819	0,12	-0,92082
0,12	-0,920819	0,12	-0,920819	0,12	-0,92082
0,12	-0,920819	0,12	-0,920819	0,12	-0,92082
0,12	-0,920819	0,12	-0,920819	0,12	-0,92082
PROMEDIO P. FINALES	-0,996076	PROMEDIO P. FINALES	-0,920819	PROMEDIO P. FINALES	-0,92082
ANTILOG PROMEDIO	0,10	ANTILOG PROMEDIO	0,12	ANTILOG PROMEDIO	0,12

Se acepta una variacion de la mitad (0.5) o dos veces (2) la sencibilidad () etiquetada del reactivo

FECHA : 28/Octubre/93		PRUEBA DE ACEPTACION DE ANALISTA EVALUACION DE LA VARIABILIDAD DE RESULTADOS POR ANALISTA			
PUNTO FINAL(EU/ml)	LOGARITMO PUNTO FINAL	PRUEBA		SENSIBILIDAD DETECTADA	PROM.
0,12	-0,920819	Fecha		Resultado	
0,12	-0,920819	1ª Prueba	19/oct./93	0,10	0,12
0,12	-0,920819	2ª Prueba	21/oct./93	0,12	DES. EST
0,25	-0,60206	3ª Prueba	26/oct./93	0,12	
PROMEDIO P. FINALES	-0,841129	4ª Prueba	28/oct./93	0,14	0,02
ANTILOG PROMEDIO	0,14				

DICTAMEN: PASA PRUEBA Variacion aceptable dentro de .25 a 0.5 UE/ml	ANALIZO: ENRIQUE GUTIERREZ SILVA.	FECHA		
		28	Octubre	1993

LAL: 1 LAMBDA = CONCENTRACION DE ENDOTOXINAS EXPRESADA EN LA SENSIBILIDAD ETIQUETADA DEL REACTIVO LAL

PERIODO DE FABRICACION: NOVIEMBRE 1993 A NOVIEMBRE 1993SOLUCIONES DE PRUEBA: SOLUCION DE GLUCOSA AL 5 %PRESENTACION: 250, 500, Y 1000 mlMETODOS DE PRUEBA: PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJOS (ANEXO 3)PRUEBA DE LISADO DE AMEBOCITO DE LIMULUS "LAL" (ANEXO 2)

LOTE	PRESENTACION	FECHA DE PRUEBA	ENDOTOXINAS	PRUEBA	
				PIROGENOS	LAL
103932A	250ml	02 / 11 / 93	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBIDAS	Negativo	POSITIVO
			1.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
			2.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
103935B	250ml	01 / 11 / 93	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBIDAS	POSITIVO	Negativo
			1.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
			2.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
103937A	250ml	03 / 11 / 93	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBIDAS	Negativo	POSITIVO
			1.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
			2.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
113966A	500ml	12 / 11 / 93	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBIDAS	Negativo	Negativo
			1.0 LAMBIDAS	Negativo	POSITIVO
			2.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
113989A	500ml	23 / 11 / 93	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBIDAS	Negativo	Negativo
			1.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
			2.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
113994A	500ml	23 / 11 / 93	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBIDAS	Negativo	POSITIVO
			1.0 LAMBIDAS	Negativo	POSITIVO
			2.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
103933C	1000ml	02 / 11 / 93	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBIDAS	Negativo	POSITIVO
			1.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
			2.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
113940C	1000ml	03 / 11 / 93	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBIDAS	Negativo	Negativo
			1.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO
			2.0 LAMBIDAS	Negativo	POSITIVO
113941C	1000ml	04 / 11 / 93	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBIDAS	Negativo	POSITIVO
			1.0 LAMBIDAS	Negativo	POSITIVO
			2.0 LAMBIDAS	POSITIVO	POSITIVO

LAL: 1 LAMBDA = CONCENTRACION DE ENDOTOXINAS EXPRESADA EN LA SENCIBILIDAD ETIQUETADA DEL REACTIVO LAL

PIROGENOS : 1 LAMBDA = 0.5 u.c. POR ml, INYECTANDO 10 ml POR Kg DE PESO VIVO

PERIODO DE FABRICACION: MARZO 1994 A MARZO 1994

SOLUCIONES DE PRUEBA: AGUA INYECTABLE

PRESENTACION: 500 Y 1000 ml

METODOS DE PRUEBA: PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJOS (ANEXO 3)

PRUEBA DE LISADO DE AMEBOCITO DE LIMULUS "LAL" (ANEXO 2)

LOTE	PRESENTACION	FECHA DE PRUEBA	ENDOTOXINAS	PRUEBA	
				PIROGENOS	LAL
113968A	500ml	15/03/94	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBDA	Negativo	Negativo
			1.0 LAMBDA	Negativo	POSITIVO
			2.0 LAMBDA	POSITIVO	POSITIVO
113009A	500ml	29/03/94	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBDA	Negativo	POSITIVO
			1.0 LAMBDA	POSITIVO	POSITIVO
			2.0 LAMBDA	POSITIVO	POSITIVO
113007A	500ml	27/03/94	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBDA	Negativo	POSITIVO
			1.0 LAMBDA	Negativo	POSITIVO
			2.0 LAMBDA	POSITIVO	POSITIVO
103916C	1000ml	27/03/94	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBDA	POSITIVO	Negativo
			1.0 LAMBDA	Negativo	POSITIVO
			2.0 LAMBDA	POSITIVO	POSITIVO
024175C	1000ml	16/03/94	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBDA	Negativo	Negativo
			1.0 LAMBDA	POSITIVO	POSITIVO
			2.0 LAMBDA	POSITIVO	POSITIVO
034285C	1000ml	10/03/94	SIN	Negativo	Negativo
			0.5 LAMBDA	Negativo	POSITIVO
			1.0 LAMBDA	Negativo	POSITIVO
			2.0 LAMBDA	POSITIVO	POSITIVO

LAL: 1 LAMBDA = CONCENTRACION DE ENDOTOXINAS EXPRESADA EN LA SENCIBILIDAD ETIQUETADA DEL REACTIVO LAL

PIROGENOS: 1 LAMBDA = 0.5 u.e. POR ml, INYECTANDO 10 ml POR Kg DE PESO VIVO

DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos se dictamina que la prueba de LAL no presenta interferencias debida a materiales y procedimientos de fabricación utilizados en México.

En algunos estudios (3,10,11) se ha reportado interferencia de una gran cantidad de productos a la prueba de LAL, la mayoría de esta interferencia es de tipo inhibitorio a la formación del gel. La mejor forma reportada de eliminar esta inhibición es diluyendo el producto las veces que sea necesaria. sin revasar la máxima dilución valida permitida.

En este trabajo de tesis se probaron los productos sin diluir y se encontró que por la sencillez de los elementos que componen la fórmula no interfieren con la respuesta de la prueba de LAL, no requiriendo diluciones ni manejo alguno, salvo el caso de la solución glucosada al 5% que en algunos casos requirió (y requerirá en pruebas rutinarias) ajustes de pH.

El correr el producto en pruebas de rutina sin diluir ahorra tiempo en el desarrollo de las pruebas, sin embargo no se descarta la posibilidad de que en la continuación de este estudio para otros productos se tenga que recurrir a diluciones para eliminar las interferencias.

En las pruebas de pirógenos en conejos en las que se inyectaron diferentes concentraciones de endotoxinas, se encontraron varios resultados falsos negativos, esto es, productos con concentraciones conocidas arriba del límite permitido (λ) y que fueron dictaminados como negativos en las pruebas de conejos, lo cual en pruebas de rutina implica repeticiones de las mismas, sin embargo estos mismos productos en las pruebas de LAL son reportados como positivos comprobando con esto la mayor especificidad de la prueba de LAL para la detección de pirógenos (endotoxinas) y una considerable menor variación de resultados que la prueba de pirógenos en conejos.

Estos resultados son similares a los encontrados por Carmine C. M. y Marlyns E.W. en los Laboratorios Travenol de Illinois E.U. (14).



CONCLUSIONES

1. Los productos siguientes:

Solución de Glucosa al 5% (250, 500 y 1000 ml)
Solución de Cloruro de Sodio al 0.9% (250, 500 y 1000 ml)
Solución Hartman (500 y 1000 ml)
Agua Inyectable (500 y 1000 ml)

elaborados en la Industria Farmacéutica Mexicana bajo las condiciones validadas de prueba en esta tesis, no presentan interferencias a la detección de pirógenos (endotoxinas).

2. La prueba de Lisado de Amebocito de Limulus (LAL) es una mejor opción para la detección de pirógenos (endotoxinas), con una variación considerablemente menor y una mayor especificidad que la prueba de pirógenos en conejos.

3. De acuerdo a los parámetros solicitados por la Guía FDA para la Validación de la prueba LAL, se considera VALIDADA la prueba de Endotoxinas Bacterianas para los productos mencionados en el punto 1.

ANEXO 1

METODOLOGIA PARA LA VALIDACION DE LA PRUEBA DE LAL SEGUN "FOOD AND DRUG ADMINISTRATION"**REQUERIMIENTOS GENERALES**

La Validación para la prueba de LAL como prueba de Pirógenos (Endotoxinas) para la liberación de un fármaco incluyen los siguientes puntos:

1. REQUERIMIENTOS INICIALES DE LABORATORIO: La Industria Farmacéutica debe evaluar la variabilidad de sus pruebas en el laboratorio antes de hacer oficial cualquier prueba. Esto se llevará cabo de la siguiente manera; cada analista a fin de ser aceptado para correr pruebas de LAL usará un solo lote de reactivo LAL y un solo lote de estándar de endotoxinas bacterianas debiendo confirmar la sensibilidad etiquetada en el reactivo () contra el estándar de referencia, y usando no menos de 4 viales del reactivo, las condiciones de aceptación para el analista sera que proporcionen una variabilidad aceptable en las pruebas, por ejemplo, que el antilogaritmo (base 10) de la media logarítmica de los puntos de gelación caiga dentro de 0.5 a 2.0 donde es igual a la sensibilidad etiquetada del reactivo en Unidades de Endotoxinas/ml.

2. PRUEBA DE INHIBICION O POTENCIALIZACION PARA CADA PRODUCTO A VALIDAR:

Estas pruebas se llevarán a cabo en cada lote de los productos a validar para demostrar que estos productos endógenamente no producen inhibición o potencialización de la reacción de gelación. Se llevará a cabo tomando una muestra del producto que contenga varias concentraciones de endotoxina estándar tales que abarquen la sensibilidad del lisado, esta serie se compara con otra serie de las mismas concentraciones de endotoxina pero diluida solamente en agua.

Las diluciones para los dos productos (muestra y agua) se realizarán con soluciones de ellos mismos, además se tomará una muestra del producto sin agregar endotoxina.

El resultado de la determinación de endotoxina en la serie con agua y en la serie del producto debera caer dentro de +/- 2 diluciones de la sensibilidad etiquetada del reactivo, si el producto mostrara inhibición, el producto podrá ser diluido, por un factor que no exceda la máxima dilución valida, y se repetiría el mismo procedimiento anterior.

FDA pide para la validación de un producto que se pruebe la inhibición y potencialización de por lo menos 3 lotes de producción de cada producto terminado (5).

ANEXO 2

PRUEBA DE LAL**EQUIPO Y MATERIAL:**

Baño de agua a 37°C +/- 1°C

Horno 250°C

Agitador tipo vortex

Cronómetro

Tubos de vidrio de 10 x 75 mm y 16 x 100 mm libres de pirógenos

Pipetas 0.2 ml, 1.0 ml, 5.0 ml, 10.0 ml libres de pirógenos

REACTIVOS:

Agua para inyectables libres de pirógenos

Lisado de amebocitos de limulus liofilizado

Estándar USP de Endotoxinas E. Coli

Acido clorhídrico 0.1 N libre de pirógenos

Hidróxido de sodio 0.1 N libre de pirógenos

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Acido clorhídrico 0.1N: Preparar en campana de extracción. Medir 8.5ml de ácido clorhídrico (37% de pureza aproximadamente) a agua suficiente contenida en matraz despirogenizado de 1000 ml. Enfriar a temperatura ambiente.

Hidróxido de Sodio 0.1N: Pesar 4 grs. de hidróxido de sodio libre de endotoxinas, colocarlo en vaso de precipitado despirogenizado conteniendo 75 ml de agua libre de bióxido de carbono, dejar enfriar la solución a temperatura ambiente, aforar con agua libre de bióxido de carbono, en matraz de 1000 ml despirogenizado.

Lisado de Amebocito de Limulus: Reconstituir el lisado añadiendo aseptícamente 5.2 ml de agua inyectable, agitar suavemente por lo menos durante 30 segundos cuidando de no hacer espuma. Dispensar 0.1 ml de lisado reconstituido en cada uno de los tubos estériles y libres de pirógenos de 10x75 mm. Congelar el lisado reconstituido a -10oC o a temperaturas mas bajas, en caso de que deba almacenarse por mas de un día. El lisado reconstituido y congelado puede almacenarse por 4 semanas antes de su utilización.

Endotoxina Estándar: Reconstituir el estándar de endotoxina según las instrucciones de la etiqueta con agua estéril y libre de pirógenos. Agitar durante 30 min. en un agitador vortex.

Diluir la endotoxina con agua estéril y libre de pirógenos a una concentración de 1UE/ml. Cada dilución debe agitarse en el vortex durante 6 min. antes de hacer la dilución siguiente. Las diluciones mayores de 1:100 no son recomendables.

Preparación de Muestra: Las muestras a ensayar deben de ser recogidas y preparadas usando material apirogénico. Las muestras a ensayar deben de ser verificadas para asegurarse de que el pH esta dentro del rango de 6.0 a 7.5. Si es necesario ajustar el pH debe utilizarse una solución de hidróxido de sodio o ácido clorhídrico libre de pirógenos.

PROCEDIMIENTO PARA PRUEBA

La prueba de LAL puede ser cuantitativa o cualitativa, en el método cualitativo (el cual se utilizara en este ensayo), el numero de controles y de muestras por duplicado dependerá del grado de exactitud y precisión que se requiera. Es recomendable que por lo menos se use un control positivo y un control negativo cada vez que se realice una prueba.

La serie completa de diluciones de la muestra deberá ser probada agregando 0.1 ml de cada una de las diluciones a los tubos de lisado por duplicado o a un solo tubo de lisado si no es necesaria tanta precisión.

Agitar suavemente el tubo para homogeneizar la mezcla, y colocarlo en el baño inmediatamente después de añadir la muestra.

Cada tubo debe ser incubado sin moverlo a 37°C +/- 0.5°C durante 60 min. +/-0.5min.

RESULTADOS

Los resultados de cada tubo de ensayo se interpretan como + o - (positivo o negativo).

Una prueba positiva se define como la formación de un gel firme y capaz de mantener su integridad si el tubo se invierte a 180°.

Una prueba negativa se caracteriza por la ausencia total del gel, o por la formación de una masa viscosa la cual no mantiene su integridad cuando el tubo se invierte 180°.

Se debe tomar en cuenta que la endotoxina a una concentración menor que el nivel mínimo de sensibilidad puede causar floculación, grumos y/o incremento en viscosidad, sin embargo, tales reacciones se consideran negativas (2,3,4,5,11,13).

ANEXO 3

PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJOS**1. CONEJOS**

Utilizar conejos adultos, sanos cuyo peso no sea menor de 1.5 Kg; que no hayan sufrido variaciones significativas de peso, por lo menos durante una semana. Y en la semana anterior a la prueba, que se mantengan con una dieta libre de antibióticos, teniendo un "período de descanso" entre pruebas por un mínimo de 48 horas (mínimo 2 semanas si la última prueba tubo una elevación de temperatura igual o mayor a 0.6°C o si estuvo involucrado en prueba positiva), y cuya "temperatura de control" satisfaga los requisitos detallados en el punto 4.

Cuando los animales no se han usado durante 2 semanas o antes de usarlos por primera vez acondiciónelo registrando la todos los pasos de una prueba de pirógenos como se indica en la técnica pero omitiendo la inyección.

El local donde se alojen los animales y se efectúen las pruebas debe permitir mantenerlos en jaulas individuales, libre de perturbaciones y tener temperatura ambiente uniforme, de 20 a 23°C , con una variación de $+ 3^{\circ}\text{C}$ sin ruido o factores que existen a los animales.

2. MATERIALES, DILUYENTES Y APARATOS

Todos los materiales que se utilicen durante la prueba tanto de vidrio como agujas y jeringas deberán estar libre de pirógenos mediante el lavado, secado y calentamiento a 250°C durante por lo menos 30 minutos, o por otro método que proporcione resultados satisfactorios.

Los diluyentes y soluciones que se empleen durante la prueba deberán estar probados como libre de pirógenos y estériles.

Cuando se especifique el uso de la solución de cloruro de sodio como diluyente utilizar solución inyectable de cloruro de sodio al 0.9%. Los sistemas de medición de temperatura deberán alcanzar la lectura máxima en menos de 5 minutos y la graduación de sus escalas deberá ser $+ 0.1^{\circ}\text{C}$ y estar calibrados contra un termómetro certificado de referencia que permita medir con exactitud de 35°C a 45°C .

3. MUESTRA

Preparar según técnica individual prescrita para cada producto o materia prima.

La solución muestra a inyectar deberá ser acondicionada a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$.

4. PRUEBA

4.1 Seleccionar conejos (3 por cada muestra a ensayar) que satisfagan los requisitos del punto 1. Suspender la administración de alimentos 10 horas antes y durante la prueba, pero dejar libre acceso al agua. Durante la prueba suspender el agua.

4.2 Pesar el día de la prueba y registrar ese peso.

4.3 Llevar los conejos a la sala de prueba y colocar en los cepos individuales; introducir el termómetro en el recto, por lo menos 7.5 cm y manteniéndolo el tiempo previamente determinado para alcanzar la lectura máxima, determinar la "temperatura de control" de cada conejo dentro de 30 minutos antes de la inyección.

No se utilicen aquellos conejos que tengan más de 39.8°C o menor que 38.5°C o que tengan variaciones previas mayores de 0.2°C (e temperaturas tomadas a intervalos de 15 - 30 minutos previas a la "temperatura de control"), o aquellos grupos de conejos cuya temperatura de control varíe en más de 1°C en la misma prueba.

4.4 Inyectar a cada conejo en la vena marginal de la oreja en un tiempo no mayor de 10 minutos después de iniciar la administración, la dosis de muestra indicada en la monografía individual. La inyección deberá efectuarse (según 4.3) dentro de los 30 minutos siguientes a la toma de la "temperatura de control".

4.5 Tomar y registrar las temperaturas 1, 2 y 3 horas después de la inyección.

5. INTERPRETACION (Y CONTINUACION DE LA PRUEBA, SI ES NECESARIO)

5.1 EL DICTAMEN GLOBAL es "PASA PRUEBA" (Correcto, muestra exenta de pirógenos), si ningún conejo muestra una elevación entre la "temperatura de control" y la temperatura a 1, 2 y 3 horas después de la inyección igual o mayor a 0.6°C y si la suma de elevaciones máximas de los 3 conejos no excede de 1.4°C .

5.2 Si uno o más conejos(s) muestra(n) una elevación igual o mayor a 0.6°C o si la suma de las elevaciones de los 3 conejos excede a 1.4°C la prueba deberá continuarse con un nuevo grupo de 5 conejos que satisfagan todos los requerimientos de la prueba. El dictamen global se extenderá acumulando los resultados de los 8 conejos.

5.3 EL DICTAMEN GLOBAL ES "PASA PRUEBA". Si no más de 3 conejos (de los empleados, presentaron elevaciones máximas iguales o mayores a 0.6°C y si la suma acumulada de las elevaciones máximas de los 8 conejos no excede a 3.7°C).

5.4 EL DICTAMEN GLOBAL ES "NO PASA PRUEBA" (incorrecto, muestra pirogénica) si 4 o más de los conejos presentaron elevaciones iguales o mayores a 0.6°C o si la suma de las elevaciones máximas de los 8 conejos es mayor de 3.7°C).

BIBLIOGRAFIA

1. BANG, F., 1956. A BACTERIAL DISEASE OF LIMULUS POLYPHEMUS, BULL. JOHNS HOPKINS HOSPITAL, PAG. 98,325.
2. BRITISH PHARMACOPOEIA COMISION. 1988. BRITISH PHARMACOPOEIA 1988. VOL I AND II. PÁG.: INTRODUCTION XXVIII, APPENDIX XIV KA 183, APPENDIX XIV A312.
3. COOPER, J.F. METODOLOGIA PARA LA VALIDACION DE PRUEBA DE LIMULUS PARA PRODUCTO TERMINADO. PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY VOL. 4, NUM.6, PAGES.72,74-79. JUNIO 1980.
4. COUNCIL OF EUROPE, BACTERIAL ENDOTOXINS, IN EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2ND ED., PART II, 11TH FASCICULE, MAISONNEUVE S.A., FRANCE, 1987, V.2.1.9.1.
5. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. DECEMBER 1987. "GUIDELINE ON VALIDATION OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST AS AN END-PRODUCT ENDOTOXIN TEST FOR HUMAN AND ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS, AND MEDICAL DEVICES". PAG. 1-39.
6. FREDERICK C. PEARSON. 1985. PYROGENS ENDOTOXINS, LAL TESTING, AND DEPYROGENATION. PAG. 11-19, 44-56.
7. GACETA MEDICA DE MEXICO. 1987. SIMPOSIO "LA EXPERIMENTACION CIENTIFICA EN ANIMALES DE LABORATORIO". VOL.123 NUMEROS 11-12. NOV.-DIC.
8. LEVIN, J. AND BANG, F.B., 1964. THE ROLE OF ENDOTOXIN IN THE EXTRACELLULAR COAGULATION OF LIMULUS BLOOD, BULL. JOHNS HOPKINS HOSPITAL, PAG. 115, 265.
9. ROGER DABBA H. "ALTERNATIVES TO ANIMAL TESTING IN USP PAST, PRESENT AND FUTURE" PHARMACOPEIAL FORUM, 18, 4416-4418 (1992).
10. RONALD N. BEZOFZKY; KAREN ZINK Mc CULLOUGH. 1990. "APLICACIONES OF LAL IN PHARMACEUTICALS AND MEDICAL DEVICES", INMUNOLOGY OF INSECTSS AND OTHER ARTHROPODS, 18, 431-433.
11. SOCIETE FRANCAISE DES SCIENCIES ET TECHNIQUES PHARMACEUTIQUES (SFSTP). 1973. LAL TEST A PRACTICAL GUIDE FOR THE DETECTION AND ASSAY OF ENDOTOXINS USINGS LIMULUS AMOEBOCYTE LYSATE, REPORT OF AN SFSTP COMMISSION.
12. SSA. 1988. 5TA. EDICION. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS V. PAG. 225-227.
13. USP CONVENTION, INC. 1989. UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII. PAG. 1493-1495, 1515-1516.

14. CARMINE C. M. AND MARLYS E.W., 1979 "LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE (LAL) TEST FOR DETECTING PYROGENS IN PARENTERAL INJECTABLE PRODUCTS AND MEDICAL DEVICES: ADVANTAGES TO MANUFACTURERS AND REGULATORY OFFICIALS" JOURNAL OF THE PARENTERAL DRUG ASSOCIATION. PAG. 81-95.