



25
27

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO
DE MICROBIOLOGIA FARMACEUTICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Q U I M I C O

P R E S E N T A

CLAUDIA AZYADEH LOPEZ PEREZ

1989

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. PROGRAMA DE PRACTICAS	3
Práctica No. 1.	4
Práctica No. 2.	39
Práctica No. 3.	74
Práctica No. 4.	98
Práctica No. 5.	120
Práctica No. 6.	141
Práctica No. 7.	166
Práctica No. 8.	186
III. DISCUSION	226
IV. CONCLUSIONES.	228
V. BIBLIOGRAFIA.	223

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

El egresado de la Facultad de Química que ingresa a la industria farmacéutica, cuando recién ha salido de la Facultad, se encuentra muy a menudo confundido ante el nuevo panorama que se le presenta, al tener que aplicar todos los conocimientos adquiridos durante sus años de estudio dentro del marco de una empresa orientada a la productividad, las utilidades y que además por tratarse de una industria farmacéutica, está orientada también a la calidad.

El nuevo profesionista tiene dos opciones en la industria farmacéutica: ingresar a una compañía transnacional o bien, ingresar a una compañía nacional.

En el primer caso se encontrará ante un mar de información, de lineamientos y de métodos de control desarrollados en otros países; que es necesario cumplir en dicha empresa precisamente por tratarse de una filial de una compañía extranjera, el proceso de aprendizaje de la filosofía y metodología farmacéutica le tomará al nuevo profesionista de uno a dos años y dominar un área específica le llevará de tres a cinco años. En el segundo caso encontrará, muy probablemente, sólo los requerimientos mínimos para manufacturar produc

tos farmacéuticos, los cuáles son exigidos por las autoridades sanitarias; pues en México son escasos los laboratorios nacionales que cuentan con la infraestructura necesaria para llevar a cabo investigaciones y los avances tecnológicos que dan entonces supeditados a la capacidad económica de la empresa.

Este trabajo está dirigido a ambos casos, con la finalidad de establecer la conexión entre los conocimientos teóricos y la parte práctica tratando de cerrar la brecha entre la universidad y la industria.

El objetivo de este manual de prácticas es tratar de dar una imagen real de lo que la microbiología farmacéutica es en la industria y por ello se escogieron los análisis microbiológicos más comúnmente efectuados en casi todas las empresas.

Más que un manual para el alumno, se ha intentado ofrecer una guía para el profesor, sobre la cual apoyarse.

El profesor en base a su experiencia acerca de los recursos disponibles dentro de los laboratorios de esta facultad podrá usar este trabajo en la elaboración de las prácticas de microbiología farmacéutica y en esa forma esta tesis será de utilidad a las generaciones futuras de estudiantes cuyos intereses estén orientados a la farmacia.

PROGRAMA DE PRACTICAS

No. PRACTICA	NOMBRE
1	Cuenta Total de microorganismos aerobios en materia prima.
2	Pruebas microbiológicas para análisis de -- agua y determinación de biocarga en produc-- tos farmacéuticos.
3	Pruebas microbiológicas para análisis de -- aire.
4	Determinación de la potencia de un antibióti <u>co</u> . Método turbidimétrico.
5	Determinación de la potencia de un antibió-- tico. Método de difusión en placa.
6	Prueba de esterilidad en inyectables. Méto-- do de filtración sobre membrana.
7	Determinación de pirógenos. Prueba USP en -- conejo
8	Determinación de endotoxinas bacterianas. Prueba del lisado de amebocitos de Limulus.

PRACTICA # 1

CUENTA TOTAL DE MICROORGANISMOS AEROBIOS EN MATERIA PRIMA.

1. INTRODUCCION

Este ensayo sirve para determinar si las materias primas para uso farmacéutico poseen la calidad microbiológica adecuada.

Los procedimientos descritos en esta práctica, permiten cuantificar los microorganismos presentes en ellas.

En la industria farmacéutica, se procura que las materias primas contengan escaso número de microorganismos, ya que sin lugar a dudas, la calidad de un producto depende en gran medida de las materias primas empleadas en su elaboración; - en este sentido, una de las tareas del profesionista químico que se desempeña en la industria farmacéutica, consiste en analizar dichas materias primas, para establecer si cumplen con las características óptimas, en cuanto a sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas.

Lógicamente, la naturaleza y vía de administración del producto determinan las cualidades que deben exhibir las materias primas; desde el punto de vista microbiológico, por lo general se requiere que éstas no contengan ciertas especies

microbianas y que el número de hongos y bacterias aerobias no rebase los límites fijados para ellas. Sin embargo, cuando están destinadas para la fabricación aséptica de preparados estériles, las materias primas, deberán estar exentas de cualquier germen.

Esta práctica, describe métodos que son usados en la industria para el control de materias primas no estériles. La amplitud y la frecuencia de los ensayos se adaptan a los riesgos reales que surgen en la práctica. Factores decisivos para la apreciación de estos riesgos son la naturaleza y el origen del material, así como los valores experimentales de que se disponga al respecto.

En cuanto a la frecuencia del control microbiológico al que son sometidas, las materias primas se clasifican de la siguiente manera:

- Las que requieren control de esterilidad obligatorio en cada lote.
- Las que requieren examen obligatorio del contenido microbiano en cada lote.
- Las que requieren que la determinación del contenido en germen sea esporádica o sistemática sólo para determinadas procedencias.

- Las que no requieren de control microbiológico alguno.

Cada compañía fija sus frecuencias de control microbiológico, ya sea en base a las políticas de calidad de la compañía misma, o bien en base a la experiencia. De cualquier manera, las materias primas deben reclasificarse periódicamente en base a los resultados obtenidos en los análisis de rutina.

El examen de las materias primas, se practica generalmente como un control a la recepción. Cuando no se está seguro de su pureza microbiológica, se solicitan, antes de la adquisición, muestras para examinarlas.

Es posible que debido a un almacenamiento de larga duración o por condiciones inapropiadas durante el mismo, los microorganismos empiecen a proliferar posteriormente en materias líquidas o en las que contienen una importante proporción de agua. Ante esta eventualidad, es necesario que se efectue un nuevo control de la materia durante su almacenamiento y/o antes de utilizarla; para ello las diferentes compañías farmacéuticas deben fijar plazos para la realización de reanálisis, determinar los períodos de caducidad y establecer las condiciones adecuadas para su conservación.

Los procedimientos usados en la industria farmacéutica, se basan en los métodos que proponen las farmacopeas más importantes, en las reglas o normas de las buenas prácticas de --

manufactura y en las recomendaciones de organismos tales como la FDA, la Federación Farmacéutica Internacional, etc.

En las farmacopeas, por un lado se fijan límites globales -- permisibles en cuanto al contenido de bacterias aerobias y hongos inferiores (levaduras y mohos) y por el otro, se exige la ausencia de ciertas especies microbianas. En este último caso describen también los métodos de análisis particulares para su determinación.

A continuación se mencionan los límites permisibles usados -- más frecuentemente; a menos que se indique otra cosa para -- cierta materia prima en particular.

- Bacterias aerobias por g o ml*	Max	1000
- Mohos por g o ml	Max	100
- Levaduras por g o ml	Max	100
- <u>Pseudomonas aeruginosa</u> por g o ml		ausente
- <u>Staphylococcus aureus</u> por g o ml		ausente
- <u>Enterobacteriaceae</u> ** por g o ml		ausente

Generalmente el ensayo para comprobar la ausencia de enterobacterias se efectúa mediante métodos cualitativos. En casos de sospecha especiales (p. ej. en sustancias biológicas de origen animal o vegetal) se puede emplear, sin embargo, -

algún método cuantitativo. En algunos casos se pide, además determinar por separado la ausencia de Escherichia coli y Salmonella.

* Para las preparaciones líquidas pueden emplearse unidades de volumen en lugar de peso.

** Por enterobacterias se entiende la familia Enterobacteriaceae según el esquema modificado de Edwards e Ewing

La toma de muestras debe efectuarse observando las medidas de precaución antimicrobianas (tales como uso de cofia, cubrebocas, guantes, etc.), seleccionando en forma óptima los instrumentos y recipientes correspondientes, los cuales deben esterilizarse previamente mediante procedimientos adecuados.

El número de muestras de las materias primas por analizar, se elige tomando en cuenta la cantidad total del material, es decir, de acuerdo al número de cuñetas o tambores; de esta forma se obtiene una muestra mezclada representativa del lote de materia prima.

En casos especiales se debe examinar un número superior de muestras; por ejemplo:

- Cuando se sospecha la presencia de gérmenes patógenos en una determinada parte de las cuñetas.

- Cuando se trata de verificar los primeros resultados.

Según la naturaleza de las materias primas se pueden usar --
los siguientes métodos:

TIPO DE PREPARADO	DETERMINACION DE CUENTA TOTAL DE MICROORGANISMOS AERBIOS	CONTROL RESPECTO A LA AUSENCIA DE CIERTAS ESPECIES
Preparados acuosos e hidrosolubles.	<u>Método de filtración sobre membrana</u> , con incubación posterior de los filtros sobre medios de cultivo sólidos.	Inoculación del material disuelto (en suspensión o emulsionado), en medios de enriquecimiento. Después de la incubación, subcultivar sobre medios selectivos sólidos.
Preparados insolubles en agua	<u>Método de recuento en placa</u> : Inoculación del material (en suspensión o emulsionado), en medios sólidos.	
Preparados insolubles en agua, poco contaminados	<u>Técnica del número más probable</u> . (Técnica del tubo múltiple): Inoculación del material en suspensión o emulsionado, en tubos en serie que contienen un medio líquido.	Proceder como se indica anteriormente o siembranse colonias obtenidas durante la determinación de gérmenes totales en medios selectivos sólidos.

Método de filtración sobre membrana: (Membrane filtration)

Este ensayo consiste, en hacer pasar a través de un filtro, por succión o mediante vacío, una cantidad del material por analizar, después de lo cual el filtro se lava con una solución adecuada; posteriormente el filtro se coloca sobre un medio sólido y se incuba.

El tamaño de poro del filtro es lo suficientemente pequeño - (0.22 ó 0.45 μ m) que los microorganismos no pueden atravesarlo.

Este método es útil cuando la sustancia que se va a analizar es líquida o soluble en agua; así mismo cuando el material - contiene sustancias inhibidoras solubles en agua; tales como los conservadores, ya que ellos inhiben el crecimiento de -- los microorganismos en este caso dichas sustancias pueden -- ser eliminadas mediante la filtración.

Método de conteo por placa: (Plate count technique)

A diferencia del método de filtración sobre membrana, este ensayo se usa cuando la sustancia o producto que se va analizar es poco soluble o insoluble en agua.

En este caso se dispersa o emulsiona una cantidad pesada del material con una solución adecuada y se toma una alícuota, - la cual es mezclada con el medio de cultivo fundido, después de lo cual se deja solidificar y se incuba.

Para este análisis se utilizan los mismos medios de cultivo que en el método de filtración, aunque hay que hacer notar - que en el método en placa, la forma de las colonias de una - especie microbiana puede variar, dependiendo de si el crecimiento se lleva a cabo en la profundidad o en la superficie del medio.

También se requiere que el material sea lo suficientemente translúcido, ya que de lo contrario las materias examinadas

forman crepúsculos visibles en el seno del material, enturbiándolo, lo cual dificulta la identificación de las colonias.

Otra diferencia con el método de filtración, es que el método de conteo en placa es más barato, ya que no requiere de filtros, los cuales son un material caro y en la mayoría de los casos son artículos de importación.

Método del número más probable: (Multiple tube method, most probable number technique).

Este método es útil cuando hay que evaluar material poco soluble en agua, poco translúcido y poco contaminado.

En esta técnica, se inocula una serie de tubos conteniendo medio líquido, con una alícuota del material emulsionado o dispersado. Acabada la incubación, se observan los tubos; contando el número de tubos con crecimiento microbiano, se puede estimar mediante inferencia estadística, el contenido de gérmenes del material inicial. Para ello se han calculado tablas, que basadas en la fórmula para límites de confianza z ; nos indican los límites entre los cuales debe encontrarse el valor real de microorganismos presente en un material dado, en base a los resultados de la muestra.

Las tablas señalan únicamente el límite superior, ya que como se trata de contaminación microbiana, el límite superior señala el máximo de gérmenes que puede tener el material, -

el límite inferior en este caso no tiene mayor relevancia. - Las tablas normalmente se calculan usando un nivel de confianza del 95%.

2. OBJETIVOS

2.1. Aplicar adecuadamente los diferentes métodos que se emplean para determinar el contenido de microorganismos en materia prima, considerando la naturaleza de esta última para la elección del método.

2.2. El alumno será capaz de:

- Efectuar una cuenta total de microorganismos por el método de filtración, (usando azúcar refinada comercial como materia prima).
- Efectuar una cuenta total de microorganismos por el método de conteo en placa (usando talco o almidón de maíz como materia prima).
- Efectuar una cuenta total de microorganismos por el método del número más probable (usando vaselina como materia prima).
- Seleccionar medios selectivos, detectar e identificar microorganismos objetables.
- Preparar diluciones confiables de la materia.

3. HIPOTESIS

Si las materias primas por analizar (azúcar, talco, almidón de maíz y vaselina) contienen bacterias:

Se observará crecimiento en el medio TSA (Tripticosa Soya-- Agar).

Si contienen hongos: se observará crecimiento en el medio - SDA (Sabovialud dextrosa agar).

Si contienen Paeruginosa, S. Aureus o Enterobacterias, se observará crecimiento en los medios específicos para dichos mi croorganismos.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Material:

Aparato de filtración adecuado (p.e.), Sartorius o Millipore).

Membranas de filtración de 0.45 um de luz de poro estériles.

Pinzas para filtro estériles.

Cajas de petri estériles.

Bomba de vacío

Pipetas estériles

Frascos de vidrio con tapa, estériles

Matraces de bola para preparación de medios

Matraces erlenmeyer para preparación de medios

Tubos para cultivo

Papel aluminio y de estraza para preparación del material

Autoclave

Mechero

Asa y porta-asa

Como muestras se usarán: azúcar común, talco o almidón de maíz y vaselina comercial; muestreados en envases estériles.

4.2. Reactivos

Tampón de solución de cloruro sódico con peptona. (Medio 1)

KH_2PO_4 3.56 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.23 g

NaCl 4.30 g

Peptona (de carne o caseína) 1.00 g

Agua destilada o desmineralizada 1000.00 ml.

Disolver los ingredientes, introducir en la autoclave a - -
120-121 C durante 15 a 20 minutos; pH: 7.0

Gelosa peptonada caseina-soya (Medio 2)

por ejemplo, use cualquiera de los siguientes preparados comerciales.

Trypticase soy agar (BBL)

Tryptone soja agar (Oxoid)

Tryptic soy agar (Difco)

Gelosa con peptona de caseina y de harina de soya (Merck)

Gelosa glucosada de Sabouraud, con cloranfenicol (Medio 3)

Babauraud dextrose agar 65.00 g

(BBL, Difco, Merck, Oxoid, p. ejem)

C loranfenicol 0.05 g

Agua destilada o desmineralizada 1000.00 ml

Medio de cultivo con peptona de caseina y soya (Medio 4)

use cualquiera de los siguientes preparados comerciales.

Trypticase soy broth (BBL)

Tryptone soja broth (Oxoid)

Tryptic soy broth (Difco).

Caldo de cultivo con peptona de caseina y de soya (Merck)

Gelosa-cetrimida (Medio 5)

p. ej.

Pseudosel agar (BBL)

Bacto cetrimide agar base (Difco)

Gelosa de Vogel & Johnson (Medio 6)

p. ej.

Vogel & Johnson agar (BBL)

Bacto Vogel & Johnson agar (Difco)

Vogel & Johnson agar (Merck)

Medio de enriquecimiento para enterobacterias (Medio 7)

Enterobacteriaceae Enrichment broth (BBL)

Enterobacteriaceae enrichment broth (Oxoid)

Caldo de cultivo de Mossel (Merck)

Gelosa bilis-glucosa al rojo violeta (Medio 8)

p. ej.

Red violet bile-agar (BBL)

Red violet bile-agar (Difco)
 Kristallviolett-neutralrot-galle agar (Merck)
Medio líquido de Sabouraud con cloranfenicol (Medio 9)

p. ej.

Sabouraud liquid medium (BBL, DIFCO, MERCK)	30.00 g
Cloranfenicol	0.05 g
Agua destilada o desmineralizada	1000.00 ml

Todos los medios de cultivo del 2 al 9 deberán ser esterilizados de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante antes de su uso.

4.3. Técnica

Dilución inicial

Las soluciones acuosas se diluyen generalmente en la proporción 1:10 con ayuda del medio 1 (Tampón de fosfatos isotónico con peptona).

Los productos hidrosolubles se disuelven en la proporción 1:10 con el medio 1.

En el caso de productos insolubles en el agua, se dispersa o emulsiona una cantidad pesada (10.0) agitando intensamente con el diluyente (medio 1) en recipientes apropiados (fras--

cos con tapa), que contengan perlas de vidrio; para este fin se añaden 9 partes del medio 1 a una parte del material a -- examinar y se homogeniza bien todo.

Cuando se trata de productos que son difíciles de poner en - suspensión o emulsionar, se agrega a una parte del material a examinar, una parte de tween 80 estéril (polisorbato 80) - y 8 partes del medio 1 y se homogeniza todo. Así se obtiene en el homogenizado, una dilución en la proporción 1:10 del - material en estudio .

La esterilización precedente del tween 80 se efectúa en la - autoclave (20 minutos a 120°C). en el caso de preparados --- emulsionables, tendrán que calentarse a 40°C, antes de su em pleo, tanto la solución tamponada de fosfatos, así como el - tween 80, estéril. Los productos difíciles de desmenuzar y homogenizar deben tratarse mediante aparatos mecánicos (P. - ej. mezclador).

Si es necesario, se preparan más diluciones con ayu' del me dio 1 para las determinaciones cuantitativas del número de - microorganismos (1:100, 1:1000, P. ej).

La elección de las diluciones se guía por los criterios si- guientes:

- Grado de contaminación supuesto.
- Necesidad de neutralizar un poder inhibidor eventual so

bre del desarrollo microbiano.

- Naturaleza del producto (dilución 1:20 ó 1:50 para los productos que poseen propiedades gelificantes por ejemplo ya que podrían solidificar el medio de cultivo)

Método de filtración.

Pesar en forma estéril 10 g. de azúcar refinada y diluir en proporción 1:10 con ayuda del medio 1 (tampón de fosfatos -- isotónico con peptona). Con este fin se añaden 10 g. de azúcar a 100 ml. del medio 1. homogeneizar bien hasta lograr la completa disolución

Método de conteo en placa:

Pesar en forma estéril 10 g. de talco o almidón de maíz y diluir 1:10 con ayuda del medio 1. Homogeneizar bien dentro del frasco una parte del talco y nueve de tampón, agitando -- vigorosamente hasta que se logre una suspensión.

Método del número más probable:

Pesar en forma estéril 10 g. de vaselina; agregar 10 g. de -- tween 80 estéril (polisorbato 80) previamente calentado a -- 40°C y 80 ml. de tampón de fosfatos (medio 1), también calentado aproximadamente 40°C. y homogeneizar todo. Así se obtiene en el homogeneizado una dilución en la proporción 1:10 del material.

Se verificará la seguridad de la técnica seguida, mediante --

ensayos en blanco (controles negativos) efectuados paralelamente en testigos; se ejecuta toda la serie de operaciones, pero sin agregar una sustancia a ensayar.

Hay que verificar antes de su uso los medios de cultivo, --- efectuando una prueba de promoción.

Cuando se examina un producto por primera vez, hay que asegurarse del valor demostrativo de la técnica empleada, mediante controles de crecimiento. Se recomienda entonces emplear diluciones del material examinado en la proporción -- 1:10, 1:100 y 1:1000 y agregar cantidades mínimas de microorganismos conocidos, susceptibles de tener importancia en la práctica. Si la primera dilución que permite una multiplicación satisfactoria de la mayoría de los gérmenes es la de 1:100 p. ejemplo, se deberá apoyar sobre ella el cálculo del número total de gérmenes. Esto es muy útil cuando se -- trata de sustancias con propiedades antimicrobianas.

Determinación de la cantidad total de bacterias aerobias y de hongos: (ver también cuadros sinópticos).

Procedimiento de filtración sobre membrana:

Bajo la protección del mechero, montar el aparato de filtración ya estéril; hacer pasar 10 ml. de la dilución inicial y lavar con 100 ml. del medio 1. Inmediatamente después del -

lavado, depositar el filtro sobre una caja petri conteniendo el medio de cultivo 2, filtrar otros 10 ml. lavar con 100 ml. del medio 1 y después del lavado depositar el filtro en una caja petri conteniendo el medio 3 (todos los ensayos deberán hacerse por duplicado). La primera caja con TSA es para la comprobación de bacterias aerobias y la segunda caja con medio sabouraud es para la comprobación de levaduras y mohos. La incubación de los cultivos deberá hacerse de 30 a 35°C. - La duración de la incubación deberá ser de 48 a 72 hrs. para bacterias y de 5 a 7 días para hongos.

Como una proliferación excesiva de ciertas especies microbianas podría dificultar la valoración, se revisan regularmente los cultivos a lo largo de la incubación y se cuenta lo más exactamente posible el número de colonias en el momento propicio. Eso da como resultado el número de bacterias y de hongos por grano de azúcar.

Al calcular la cantidad de bacterias aerobias, se habrá de prestar atención al hecho de que las levaduras y mohos pueden crecer también en el medio 2. Por otra parte, es posible que no solamente las levaduras y los mohos se desarrollen en el medio 3, sino también las bacterias resistentes al cloranfenicol. En los casos dudosos, se deberá recurrir a la tinción de Gram y a los ensayos microscópicos para interpretar los resultados.

Procedimiento por conteo en placa:

Todas las manipulaciones deberán hacerse bajo la protección del mechero, de la dilución inicial se toman 10 ml. y se hace una segunda dilución 1:100, agregando 90 ml. de tampón -- (medio 1), en un frasco y agitando bien. De la dilución - - 1:100 se toman 10 ml. y se hace una tercera dilución 1:1000, agregando 90 ml. de tampón (medio 1) y se agita bien en un - frasco.

Se funden los medios de cultivo TSA y SDA (medios 2 y 3) en un baño maría a 45°C (deben haber sido esterilizados previamente).

Se toma 1 ml. de cada dilución (1:10, 1:100 y 1:1000), se mezcla cada una con 15 ó 20 ml. del medio de cultivo 2 en cajas petri, efectuando un movimiento suave en forma rotatoria para que se homogenice la muestra con el medio de cultivo, y se permite solidificar a temperatura ambiente; y se repite - la operación, pues todos los ensayos deben hacerse por dupli - cado.

Al hacer esto se obtendrán dos cajas por cada dilución, es - decir, seis cajas en total para el medio 2 (TSA).

Se toma nuevamente 1 ml. de cada dilución, se mezcla cada -- una con 15 ó 20 ml. del medio de cultivo 3, en cajas petri - dando un movimiento suave a la caja en forma circular para -

que homogenize la muestra con el medio, se permite solidificar a temperatura ambiente. Repetir la operación, para obtener el análisis por duplicado, con lo que se deben obtener seis cajas para el medio 3 (SDA), esto hace un total de doce cajas para la determinación de bacterias y hongos.

La incubación de los cultivos tiene lugar de 30 a 35°C. La duración de la incubación es de 48 a 72 hrs. para bacterias y de 5 a 7 días para hongos. Se controlan regularmente los cultivos a lo largo de la incubación y se cuenta lo más exactamente posible, el número de colonias en el momento adecuado.

Al calcular la cantidad de bacterias y hongos, habrá que --- prestar atención al hecho de que hay que multiplicar el número de colonias encontrado, por la dilución, para saber el número de colonias existente en 1 g. de talco o almidón, P. -- ej., si la caja que contiene la dilución 1:10 se encuentran tres colonias, el número real de colonias que cabe esperar - en 1 g. será de 30 colonias.

Procedimiento del tubo múltiple.

Colocar 9 ml. del medio 4 (TSB) en 14 tubos a utilizar. El material homogeneizado se inocula de la siguiente manera: - formar cuatro grupos de tres tubos cada uno, identificar los restantes como el tubo A y B. Marque uno de los juegos como controles. Tome otro de los juegos (100 ul), y en cada tubo

al igual que en el tubo A, coloque 1 ml. de la dilución inicial, que contiene la materia prima a analizar y mezcle. -- Del tubo A tome 1 ml. con pipeta y vacíe el contenido al tubo B y mezcle. Estos dos tubos contienen 100 y 10 mg. de la muestra respectivamente, (o bien 100 ul. y 10 ul. en el caso de que usaran unidades de volumen).

Tome el tercer juego (10 ul), y pipete 1 ml. del tubo A en cada uno y mezcle. Tome el último juego (1 ul), y pipete 1 ml. del tubo B en cada uno y mezcle. Descarte el contenido de los tubos A y B que no se haya usado.

Cierre bien los tubos e incube a 30°C, durante 3 a 5 días; - proceda de la misma forma para inocular otros 14 tubos, pero ahora usando el medio 9 (SDB). Use las mismas condiciones - de incubación. Después del período de incubación, examine - los tubos y observe los tubos de control, los cuales deben - permanecer claros y transparentes; después observe los tubos conteniendo la muestra y vea si existe crecimiento.

Mediante el número de tubos en que se observa el crecimiento microbiano se puede estimar, según las reglas de las estadísticas, el contenido de gérmenes en el material inicial, contenido cuyo límite superior de confianza para $P = 95\%$ está indicado en la tabla siguiente:

T A B L A

CUENTA TOTAL MAS PROBABLE PARA EL METODO DEL TUBO MULTIPLE

Combinaciones observadas de
tubos mostrando crecimiento
en cada juego.

Cantidad en mg. o ml. de muestra
por tubo.

100 mg. 100 ul	10 mg. 10 ul	1 mg. 1 ul	Número más probable de microorganismos - por gramo o milili- tro.
3	3	3	> 1 100
3	3	2	1 100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	95
3	0	2	60
3	0	1	40
3	0	0	23

Identificación de especies microbianas intolerables.

Para determinar los gérmenes especiales cuya presencia no es permisible, se parte de la dilución inicial 1:10

Esta parte comprende los ensayos siguientes:

- Identificación de Pseudomonas aeruginosa en 1 g. o ml.
- Identificación de Staphylococcus aureus en 1 g. o ml.
- Identificación de Enterobacteriaceae en 1 g. o ml.

Identificación de Pseudomonas aeruginosa:

Inocular 10 ml. de la dilución inicial 1:10 en 100 ml. del medio 4 (caldo de cultivo caseína-soya peptonado); incubar a 37°C. durante 18 a 24 horas (enriquecimiento no selectivo). Enseguida extender una asada de este material sobre el medio 5 (gelosa-cetrimida) con objeto de obtener, en caso de resultado positivo, colonias aisladas. Incubar a 37°C. durante 24 a 48 horas; la aparición de colonias constituídas por bacilos Gram negativos, las cuales producen un pigmento verdoso o verde intenso difusible en el medio de cultivo, es característica de Pseudomonas aeruginosa. Si la producción colorante del colorante es débil o nula, se deberán de realizar pruebas confirmativas tales como la de oxidasa, crecimiento a 42°C. en el intervalo de 24 a 48 horas u otras reacciones bioquímicas. Si después de examinar las placas -

ninguna de las colonias encontradas muestra las características antes mencionadas o no se evidencia crecimiento; la muestra cumple con los requerimientos de ausencia de P. aeruginosa.

Identificación de Staphylococcus aureus:

Del mismo cultivo obtenido para enriquecimiento no selectivo (según el párrafo anterior), tomar una asada y extenderla sobre el medio selectivo # 6, (gelosa de Vogel-Johnson), con objeto de obtener, si el resultado es positivo, colonias aisladas. Incubar a 37°C. durante 24 a 48 horas, la aparición de colonias negras integradas por cocos Gram positivos y rodeados por una zona amarilla, es típico del estafilococo dorado.

Los resultados positivos deben confirmarse mediante las pruebas de la desoxirribonucleasa o de la coagulasa en plasma. - Si después de examinar las placas ninguna de las colonias encontradas muestra las características mencionadas o no se aprecia crecimiento; la muestra cumple con los requerimientos de ausencia de S. aureus.

Identificación de Enterobacterias:

Partiendo del mencionado cultivo enriquecido en el medio 4, se toman 10 ml. y se siembran en 100 ml. de medio selectivo 7 (medio de enriquecimiento para enterobacterias), se incuba

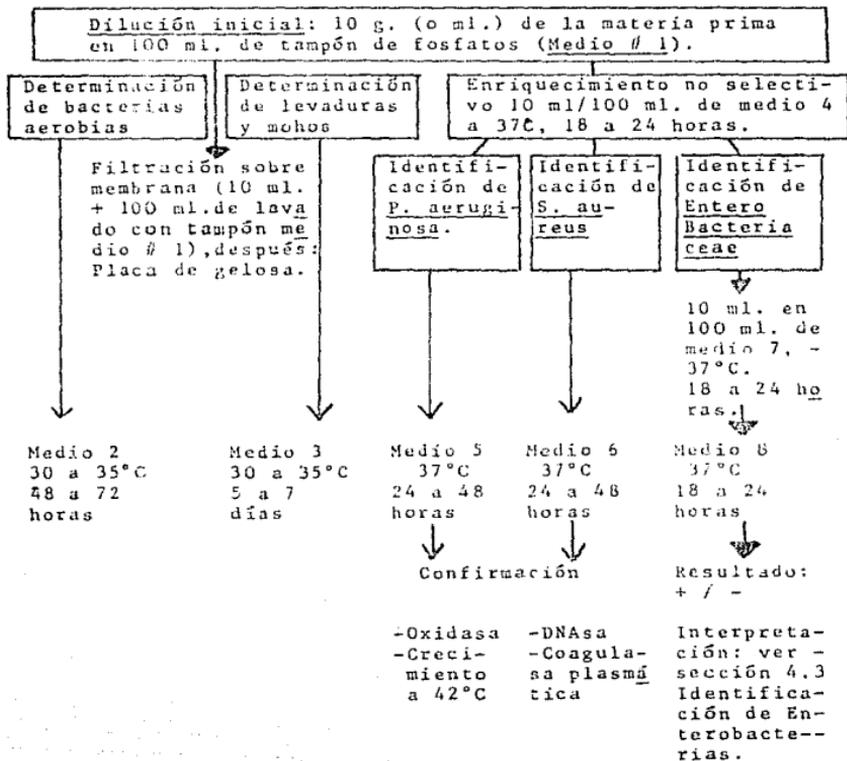
a 37°C. durante 18 a 24 horas (enriquecimiento selectivo), a continuación se toma una asada y se extiende sobre la superficie del medio de cultivo 8 (gelosa-bilis-glucosa-rojo violeta), con objeto de obtener colonias aisladas en el caso de resultados positivos. Incubar este último a 37°C, durante 18 a 24 horas; la aparición de colonias rojas o rojizas, de bacilos Gram negativos es característica de los gérmenes de la familia de las Enterobacterias. Algunas especies taxonómicamente vecinas de bacterias Gram negativas (Aeromonas P. ej.) muestran un comportamiento similar y deben considerarse también como indeseables. Si ninguna de las colonias encontradas muestran las características antes mencionadas o no se aprecia crecimiento; la muestra cumple con los requerimientos de ausencia de Enterobacterias.

Los datos sobre medios para identificar de manera bioquímica a *E. coli* y otras Enterobacterias, se obtienen consultando la literatura especializada. Para la realización de las pruebas correspondientes, existen en el comercio, los medios de cultivo deshidratados.

Cuadros sinópticos:

En las páginas 32, 33 y 34 se encuentran cuadros de orientación sobre la marcha a seguir para los ensayos.

CUADRO SINOPTICO
METODO DE FILTRACION SOBRE MEMBRANA



CUADRO SINOPTICO

METODO DE CONTEO EN PLACA

Dilución inicial: 10 g. (o ml.) de la materia prima en 100 ml. de tampón de fosfatos (Medio # 1).

Determinación de bacterias aerobias

Diluciones sucesivas (1:10, 1:100, 1:1000). Incorporaciones a placas de gelosa; cada dilución por duplicado.

Medio 2
30 a 35°C
48 a 72
horas

Determinación de levaduras y mohos

Identificación de P. aeruginosa

Medio 5
37°C
24 a 48
horas

Confirmación

-Oxidasa
-Crecimiento a 42°C

Enriquecimiento no selectivo 10 ml/100 ml. de medio 4 a 37°C. 18 a 24 Hr.

Identificación de S. aureus

Medio 6
37°C
24 a 48
horas

-DNAsa
-Coagulasa plasmática

Identificación de Enterobacteriaceae

10 ml. en 100 ml. de medio 7, - 37°C. 18 a 24 horas.

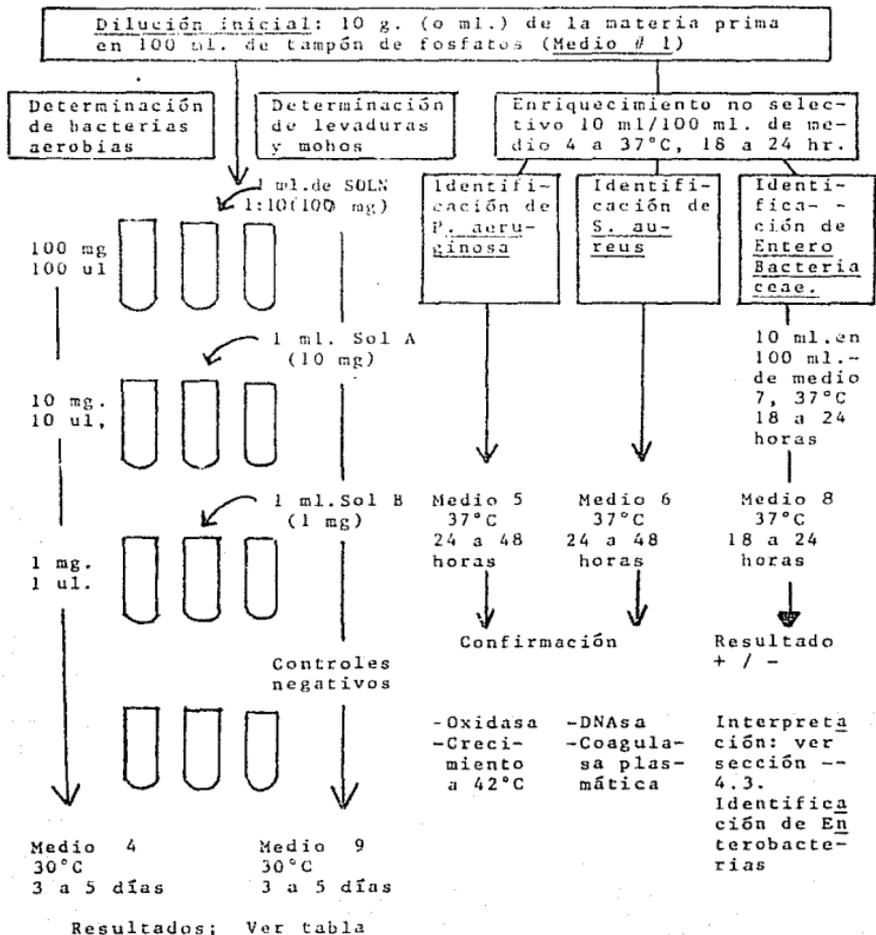
Medio 8
37°C
18 a 24
horas

Resultado:
+ / -

interpretación: ver sección 4.3 Identificación en Enterobacterias.

CUADRO SINOPTICO

METODO DEL NUMERO MAS PROBABLE



5. REGISTRO Y ORGANIZACION DE DATOS:

El informe de análisis deberá contener datos cuantitativos sobre el número de bacterias aerobias, así como el de levaduras y mohos que se han encontrado (ver formatos de reporte).

Si el número de gérmenes es inferior al límite de detección el resultado será indicado así: (inferior) a $< x/g$ ó $< x/ml$.

Los ensayos encaminados a probar la ausencia de ciertas especies microbianas intolerables pueden ser resumidos en el Informe de Análisis, bajo la rúbrica "Gérmenes especiales". - Si un ensayo de esta índole ha dado un resultado positivo, - habrá que mencionar en el informe la clase de germen encontrado.

En el caso de resultados sospechosos, el informe deberá contener datos sobre la significación práctica del resultado, - así como sobre las fuentes de contaminación.

Registrar los datos de la siguiente forma:

REPORTE DE ANALISIS DE MATERIALES
 UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
 FACULTAD DE QUIMICA
 Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

PRACTICA No. : _____

MATERIA PRIMA	CANTIDAD:	
DETERMINACIONES	LIMITES	RESULTADOS
Bacterias aerobias por g.	Máximo 1000	_____
Mohos por g.	Máximo 100	_____
Levaduras por g.	Máximo 100	_____
Gérmenes especiales: (<u>P.</u> <u>aeruginosa</u> , <u>S. Aureus</u> y <u>Enterobacteriaceae</u> en 1 g)	Ausentes	_____
ANALIZADO POR:	FECHA:	

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

- De acuerdo a los límites proporcionados en la hoja de reporte de esta práctica, la materia prima que usted analizó. ¿Está dentro o fuera de límites?
- Si los resultados que usted obtuvo, están fuera de límite, explique las posibles causas de error.
- ¿Por qué se usa un medio de enriquecimiento no selectivo en el caso de la determinación de gérmenes especiales?
- ¿Por qué se usa un medio selectivo para Enterobacterias además del enriquecimiento previo no selectivo, para su determinación?
- ¿Por qué se usa una solución tampón para disolver la muestra inicialmente?
- ¿Qué alternativas hay en cuanto al uso del mechero?
- Si el resultado de su análisis fuese favorable pero su control negativo hubiese resultado contaminado: ¿invalidaría el análisis? ¿Por qué?
- ¿Cuál es la razón de que los medios de cultivo 2 y 3 (TSA y SDA) en el método de conteo en placa, permanezcan en estado líquido pero a temperatura no mayor de 45°C?

- En la prueba de identificación de S. aureus: ¿A que se debe la formación de un halo amarillo?. ¿Cuál es el color original del medio de Vogel-Johnson?
- Explique por que se colorean de rojo las Enterobacterias en el medio 9 (Gelosa-bilis-glucosa-rojo violeta).
- ¿Cuál es la razón de usar tween 80 y calentarlo a 45°C para preparar la dilución inicial en el análisis de vaselina?.

7. BIBLIOGRAFIA:

- Baggerman C., Kannegieter L. M., Microbiological contamination of raw materials for large-volume parenterals, Appl Environ Microbiol., Sep 1984, 48 (3) p. -- 662-664.
- Berry, Ira R., Process validation of raw materials, - Pharm. Tech., 5:38-39 Feb 1981
- Bonalsky J. R., A model system for testing raw material for microbial content, Pharm. Tech., 4:49-51 - (Feb) 1980
- Bruch C. W., Objectionable microorganisms in non -- sterile drugs & cosmetics, D & C!, October 1972
- Buhlmann X., Microbiological quality of pharmaceutical preparations, American Journal of Pharmacy, Nov-Dec - 1972
- Chatterjee A., Radiometric detection of Pseudomonas - aeruginosa in pharmaceutical products, Pharm. Tech. - 4:45-48 (Abr) 1980
- Dixon J. R., Quality assurance and quality control of commercially prepared microbiological powder media, - Pharm. Tech., 1: 27-30 (Sep) 1977
- Florey K. G., Pharmaceutical analysis, Amer. Pharm., 21:8, Aug 1981, p. 30-35
- Gay M., Testing the efficacy of antimicrobial preservation: pharmacopeial requirements, practical experience, and drug safety, Pharm. Tech., May 1983
- Hopes T. m., Quality control of raw materials, D & C I, April 1972, p. 46-49, 134-138.

- Juran/Gryna "Quality planning and analysis", 2nd Ed., p. 59/67, Mc Graw Hill Book Company, 1980
- Lachman et al, The theory and practice of industrial pharmacy, 3rd ed., Lea & Febiger, 1986 Philadelphia
- Malcolm S. A., Microbiological monitoring and quality control, Manufacturing chemist & aerosol news, Nov - 1980 p. 55-56.
- Mead W. J., Control of raw materials, Cosmetics & Toiletries, Vol. 94, January 1979, p. 43-45
- Murty R., Kapoor J., Purity standards for ingredients used in parenteral preparations, Pharm. Tech. 4:60-63 (Feb) 1980
- Palmieri M. J., FDA methodology for the microbiological analysis of cosmetics and topical drugs, J. Soc. Cosmet. Chem., 34, Jan-Feb 1983.
- Price J.M., Establishing microbiological specifications for pharmaceuticals not required to be sterile, Pharm. Mfg., April 1984 p. 26-29
- Riggs T.H., Supplier insurance, how much do you need?, MD & DI, 1:3 August 1979 p. 14-15.
- Schlesinger R., Prequalification of raw materials-an R & D challenge, MD & DI sep 1979 p. 17-25
- Spooner D., Microbiology training and pharmaceutical production, Bull. Parenter. Drug Assn., 27:6 (Nov-Dec) 1973 p. 257-265.
- USP XXI, United States Pharmacopeia 1985

PRACTICA # 2

"PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS PARA AGUA DE USO FARMACÉUTICO Y DETERMINACION CON BIOCARGA EN SOLUCIONES PARENTERALES".

1. INTRODUCCION

Dado que el agua es la sustancia más empleada en la industria farmacéutica, su calidad reviste gran importancia. Sin embargo, su adecuado control enfrenta dificultades excepcionales, ya que la fuente básica (usualmente el sistema municipal), está afectada por muchos y variados factores; entre éstos dos de los más importantes son: su contenido de sólidos y de microorganismos.

El agua es requerida para una infinidad de propósitos, los cuales van desde su uso en los procesos de manufactura hasta la preparación final de agentes terapéuticos, justo antes de su administración a los pacientes.

Como se sabe el agua constituye la fuente de la vida; sin embargo, en la industria farmacéutica puede representar un peligro, ya que frecuentemente el agua funciona como un acarreador de contaminantes por contener algunos de los nutrientes necesarios para la reproducción de los microorganismos.

Teóricamente, los gérmenes no pueden crecer en el agua pura, sin embargo, toda agua, no importa cuán cuidadosamente haya sido destilada o filtrada, contiene trazas de materia orgánica y sales disueltas que permiten la proliferación microbiana.

El agua químicamente pura es una sustancia insabora, de hecho son las impurezas las que le confieren su sabor. La mayoría de la gente se sorprendería al enterarse de que el agua que bebe es, la mayoría de las veces, inadecuada para el procesamiento y fabricación de alimentos, drogas, equipos médicos y productos cosméticos.

Dicho de otra manera, el agua tal como puede obtenerse de la naturaleza, nunca se encuentra 100% pura, pues siempre contiene microorganismos, materia orgánica, minerales y gases disueltos.

El agua "cruda" se obtiene a partir de dos fuentes básicas: la tierra (pozos) y la superficie (lagos, reservorios, ríos, etc).

El agua proveniente de un pozo es usualmente muy "dura" como resultado del contacto con los depósitos minerales del pozo mismo; sin embargo, la filtración natural a través de las áreas arenosas adyacentes da como resultado que el agua de pozo sea relativamente clara y de bajo contenido orgánico.

En contraste, el agua obtenida de la superficie suele tener concentraciones considerablemente más bajas de minerales disueltos, pero su contenido orgánico es usualmente más elevado.

Antes de que cualquier tipo de "agua cruda" pueda ser usada en los procesos de manufactura, debe ser filtrada o destilada para que adquiera el nivel requerido de pureza.

La farmacopea incluye varias monografías para agua: de las cuales, la de agua purificada y la de agua para inyección, definen los requisitos para agua como ingrediente material, mientras que las otras monografías establecen los estándares para el agua como artículo farmacéutico en sí.

Agua purificada. - Se denomina así al agua que ha sido tratada mediante un proceso de destilación, de intercambio de iones (desionización o desmineralización) de ósmosis reversa, o por algún otro proceso adecuado que la convierta en agua pura para propósitos farmacéuticos. Esta agua cumple rígidamente las especificaciones de pureza química, es preparada a partir de agua que cumple los requerimientos para ser agua potable (agua para beber), y además de cumplir éstos, no contiene ninguna sustancia añadida. Sin embargo, los diferentes métodos de producción presentan considerables posibilidades diferentes de contaminación.

El agua purificada por destilación llega a ser estéril, siempre y cuando el aparato de destilación sea el adecuado y además estéril; mientras que por otra parte las columnas intercambiadoras de iones, así como las unidades de ósmosis reversa requieren especial atención, ya que ambas poseen sitios - donde los microorganismos pueden alojarse, multiplicarse y - entrar así en el torrente. Por ello se deberá efectuar un - monitoreo frecuente cuando se usan este tipo de unidades, -- particularmente después de un período en el que el sistema - ha estado detenido por más de unas horas.

Agua para inyección. - Por definición, esta es agua purificada por destilación o por ósmosis reversa y cumple los requerimientos de pureza especificados para "agua purificada". -- No necesita ser estéril, pero para poder cumplir con los límites para endotoxinas bacterianas, debe ser producida, almacenada y distribuida en forma tal, que los microorganismos - (si los hay) no se encuentran en números elevados y por tanto no se libere una cantidad peligrosa de dichas sustancias pirogénicas.

Lineamientos para el control microbiológico del agua como ingrediente.

Dado que tanto el "agua purificada" y el "agua para inyección" pueden ser producidos de diferentes maneras y que por tanto su calidad microbiológica puede variar, de acuerdo al

método de obtención, distribución y/o almacenamiento; en este sentido es aconsejable el establecimiento de criterios -- que provean indicaciones adecuadas acerca de las acciones -- que deben ser tomadas como medidas correctivas. Los sistemas de agua deionizada, por ejemplo deben ser validados no sólo antes de habilitarlos como fuente de agua purificada, sino que deben estar sujetos también a los controles adecuados relativos tanto a la capacidad química del sistema (indicadores de recarga por ejemplo) como a los aspectos microbiológicos y otras consideraciones. Una cuenta total de microorganismos aerobios de 500 unidades formadoras de colonias - por ml. (ufc) podría ser adecuada para agua potable mientras que para agua purificada dicho número podría ser de 100 ufc/ml. y para agua empleada en productos inyectables debe ser de 50 ufc/ml. Dado que el agua usada como ingrediente en -- productos farmacéuticos no es producida como un lote o cantidad fijas, las cifras antes mencionadas sirven como indicadores para tomar alguna acción cuando son alcanzadas o excedidas.

En la práctica, el agua usada como ingrediente en la manufactura de artículos farmacéuticos y su análisis, son llevados a cabo simultáneamente y los resultados de las pruebas microbiológicas sólo están disponibles hasta después de que algunos artículos farmacéuticos ya han sido producidos.

Las acciones a ser tomadas para obtener agua con calidad microbiológica suficiente para ser usada como ingrediente pueden incluir sanitización del sistema, con subsiguiente muestreo y monitoreo para asegurarse que la acción correctiva ha sido adecuada y establecer procedimientos si las pruebas microbiológicas indican persistencia de la falla.

Según lo expuesto anteriormente, es necesario que el sistema de agua para manufactura farmacéutica posea instalaciones correctivas, además de las de producción; es decir: instalaciones para sanitización, tratamiento con vapor, descontaminación por cloración, almacenamiento a alta temperatura, filtración, tratamiento con radiación u algún otro procedimiento, de acuerdo a las necesidades del establecimiento de contar con una calidad aceptable de agua. Cabe señalar que todos esos sistemas de control para obtener agua de calidad -- adecuada para ser, usada como ingrediente no representan un sustituto de las buenas prácticas de manufactura, sino por el contrario, refuerzan la continua necesidad de las GMPs -- puesto que la calidad de agua como ingrediente está sujeta a diferentes condiciones microbiológicas en diferentes tiempos.

A continuación se proporciona una lista de algunos de los sitios que deben ser muestreados en un laboratorio farmacéutico; desde luego, esta podría variar dependiendo de las instalaciones de cada compañía:

SITIOS DE MUESTREO PARA ANALISIS DE AGUA NO DESTILADA

<u>SITIO</u>	<u>FRECUENCIA</u>	<u>VOLUMEN (1)(4) LIMITES P/ANALISIS</u>	<u>LIMITES</u>
Cisternas o tanques de almacenamiento	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	Ver (2)
Entrada de agua cruda	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */ml. 0 */ml.
Filtro(s) de arena	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */ml. 0 */ml.
Filtro(s) de carbón	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */ml. 0 */ml.
Salida del suavizador	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */ml. 0 */ml.
Salida de cada deionizador	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */ml. 0 */ml.
Agua deionizada para preparación de equipo	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */ml. 0 */ml.
Agua deionizada para prep. de componentes	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */ml. 0 */ml.
Agua de enfriamiento de autoclave, circuito cerrado (3) (5)	Semanal	CT 1000 ml.	10/1000 */ml.

<u>SITIO</u>	<u>FRECUENCIA</u>	<u>VOLUMEN(1)(4) P/ANALISIS</u>	<u>LIMITES</u>
Agua de enfriamiento de autoclave, circuito no cerrado (3)	Semanal	CT 100 ml.	10/100 */ml.
Efluente del sistema de ósmosis reversa	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */ml. 0 */ml.
Tanque(s) de almacena- miento de ósmosis re- versa.	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */ml. 0 */ml.

* = ufc (unidades formadoras de colonias).

Muestras especiales

Antes de que nuevas cisternas, filtros de carbón, suavizadores, deionizadores y tanques de almacenamiento sean puestos en uso, se tomarán muestras en tres días sucesivos. El equipo puede ser puesto en uso si cumple con los límites y criterios de evaluación.

Las cisternas, filtros de arena, filtros de carbón, suavizadores, deionizadores y tanques de almacenamiento que no estén en uso por un período mayor a tres días, deben ser muestreados dentro de las 24 horas después de que la unidad haya sido puesta en servicio (3).

Los filtros de arena, filtros de carbón, suavizadores y deionizadores a los cuales se les haya efectuado un mantenimiento mayor que pudiera afectar las camas y que sea diferente del de rutina, de drenado o recargado; deben ser muestreados dentro de las 24 horas después de que la unidad haya sido puesta en servicio.

Si las camas de los filtros de arena, suavizadores, deionizadores y filtros de carbón son reemplazados, el equipo debe ser muestreado en tres días sucesivos, empezando dentro de las 24 horas después de que la unidad es puesta en servicio.

Antes de que nuevas autoclaves sean puestas en operación, -- tres muestras sucesivas del agua de enfriamiento deben cum--

plir los límites.

NOTAS:

- (1) El volumen de muestra para la cuenta total debe ser ajustado de manera que no produzca consistentemente cuentas arriba de 200 colonias/filtro. El volumen de muestra para la cuenta de coliformes debe ser ajustado de manera - que no produzca consistentemente cuentas arriba de 80 colonias de coliformes/filtro, con no más de 200 colonias de todos los tipos.
 - (2) Las cisternas y tanques de almacenamiento deben ser muestreadas con el fin de establecer una norma para la carga bacteriana del agua que entra al sistema.
 - (3) Efectuar tinción de Gram a las colonias representativas de cada muestra.
 - (4) Abreviaturas: CT = cuenta total, CC = cuenta colifor- - mes
 - (5) En las autoclaves con circuito cerrado de enfriamiento, el agua de enfriamiento debe ser muestreada durante los últimos 5 minutos de enfriamiento. En autoclaves con - enfriamiento sin circuito cerrado, muestrear en cual- - quier momento durante el enfriamiento.
- Estas muestras no son aplicables a autoclaves que no -- tengan ciclos con sistema de enfriamiento de agua inter

no.

SITIOS DE MUESTREO PARA ANALISIS DE AGUA DESTILADA

<u>SITIO</u>	<u>FRECUENCIA</u>	<u>VOLUMEN P/ANALISIS</u>	<u>LIMITES (4)</u>
Cada salida del destilador	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */100 ml 0 */100 ml
Salidas de los cuartos de preparación(1)	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */100 ml. 0 */100 ml
Salidas para lavado de partes de equipos (1)	Semanal	CT 100 ml. CC 100 ml	50 */100 ml 0 */100 ml
Salida de agua destinada al tanque de mezcla	Diario	CT 100 ml. CC 100 ml.	50 */100 ml 0 */100 ml
Tanque de almacenamiento de agua destilada (2) (3)	Diario	CT 100 ml. CC 100 ml	50 */100 ml 0 */100 ml

* = ufc (unidades formadoras de colonias)

Para sistemas de agua destilada con circuito cerrado recirculante: es necesario tomar una muestra de una salida de cada circuito diariamente. Rote las muestras de manera que cada salida de cada circuito sea muestreada al menos una vez al --

mes. Si el sistema contiene sólo un circuito de recirculación, se deberá muestrear el tanque de almacenamiento diariamente. Si el sistema tiene más de un circuito, el tanque no necesita ser muestreado rutinariamente. Si más de una muestra de agua destilada presenta una cuenta fuera de límites, el tanque de almacenamiento debe ser muestreado diariamente hasta que el problema sea resuelto.

Muestras especiales:

Antes de que nuevos destiladores y tanques de almacenamiento sean puestos en uso, se tomarán muestras en tres días consecutivos. El equipo puede ser puesto en uso si se cumplen -- los límites y criterios de evaluación (2)

Cualquier nueva línea principal o ramas de líneas principales debe ser muestreada dentro de las 24 horas, después de haber sido puesta en servicio (2)

Cualquier nueva salida de una línea principal debe ser muestreada dentro de las 24 horas, después de haber sido puesta en servicio (2)

Después de cualquier mantenimiento en los destiladores, tanque o líneas que pudiera afectar la integridad de la vía de agua destilada muestree la unidad dentro de las 24 horas después de haber sido puesta en servicio (2)

NOTAS:

- (1) Pruebe cada salida por lo menos una vez al mes mediante el muestreo del número apropiado cada semana.
- (2) Si las cuentas exceden los límites, efectúe tinción de Gram de las colonias representativas de cada muestra.
- (3) En plantas donde hay un sólo tanque de almacenamiento de agua destilada el cual no tiene una válvula de muestreo que sea fácilmente accesible y donde una válvula de muestreo no puede ser instalada sin formar una pierna muerta, (tubería extra que puede provocar que el agua se estanque y favorezca el crecimiento de microorganismos).
- (4) Los límites para un sistema de agua destilada con circuitos de recirculación cerrados son:

Cuenta total: 10/100 ml.

Cuenta de coliformes: 0/100 ml.

Determinación de Biocarga

Es la determinación microbiológica (CT, CC y cuenta con esporas) que se hace a las soluciones parenterales antes de ser esterilizadas con la finalidad de asegurar que la cantidad y tipo de microorganismos presentes en la solución antes de esterilizarse cumple los criterios para los cuales fue vali-

do el ciclo de esterilización. Todos los ciclos de esterilización son validados teniendo en cuenta el grado de contaminación esperado en un lote normal, para asegurar una probabilidad de 10^{-6} microorganismos sobrevivientes. Las muestras de rutina que se necesitan para la determinación de la biocarga se toman de cada lote, por cada día de producción, en general se toman muestras del tanque con la solución y muestras del principio y del fin del lote.

En las muestras que corresponden al fin del lote se hace además la determinación adicional de conteo de esporas. Los límites de alerta para la biocarga deben ser establecidos basados en datos históricos y por impacto al producto, pero debe establecerse su procedimiento estándar de operación en el cual se explique cómo fue establecido el límite, la frecuencia a la cual el límite debe ser revisado contra los datos actuales y la acción requerida si el límite de alerta es excedido. De cualquier manera el límite que se establezca no deberá ser mayor de 500 ufc/100 ml. (cuenta total o 50/100 - ml. cuenta de coliformes)

M U E S T R E O

<u>MUESTRA</u>	<u>VOLUMEN</u>	<u>LIMITES</u>
Solución en el tanque de mezcla (1), (3)	CT 100 ml. CC 100 ml.	Por procedimiento en base a datos históri cos.
Primera de lote (1), (2), (3)	CT 100 ml. CC 100 ml.	Por procedimiento en base a datos históri cos.
Fin de lote (1), (2), (3)	CT 100 ml. CC 100 ml. CE 1000 ml.	Por procedimiento en base a datos históri cos. 10/1000 ml

NOTAS:

- (1) El volumen de muestra para la cuenta total debe ser ajustado de manera que no produzca consistentemente cuentas arriba de 200 colonias por filtro.
- (2) Si el volumen del contenedor del producto es menor que el indicado en la Tabla, pruebe una unidad entera para cuenta total, una unidad entera para cuenta de coliforme y una unidad entera para cuenta de esporas.
- (3) Si la cuenta excede los límites, efectúe una tinción de Gram a las colonias representativas de cada muestra.

- (4) Abreviaciones: CT = cuenta total
CC = cuenta de coliformes
CE = cuenta de esporas.

En el caso de esta práctica, se simulará la solución a la ---
cuál se le determinará la biocarga, preparando una solución -
de Dextrosa al 5%, una hora antes de efectuar la determina- -
ción.

2. OBJETIVOS:

En esta práctica se establecen las determinaciones que se ha-
cen al agua como sistema crítico en la manufactura de fárma--
cos, así como la determinación de la biocarga a una solución
que va a ser esterilizada.

El alumno será capaz de:

- Describir la importancia del agua como ingrediente en la industria farmacéutica. Llevar a cabo adecuadamente el análisis biológico de los diferentes tipos de agua.
- Emplear el concepto de biocarga y enumerar los motivos de determinarla antes de un reproceso de esterilización.
- Aplicar correctamente el método de recuento de esporas y M. O. por filtración con membrana para determinar la cantidad microbiológica del agua.

3 . HIPOTESIS

Si las muestras para cuenta total de agua destilada, desminé-
ralizada y solución de dextrosa al 5% contienen bacterias, -
se observará crecimiento en la membrana sembrada en medio --
TSA.

Si las muestras contienen enterobacterias se observará creci-
miento en la membrana sembrada en medio endoles.

Si la muestra para la simulación de determinación de biocar-
ga (sol dextrosa al 5%) sometida al choque térmico, contiene
microorganismos esporulados, se observará crecimiento de la
membrana sembrada en la otra caja de TSA.

Como el número de colonias observadas es proporcional a la -
contaminación presente en la muestra entonces se obseraran -
mayor número de colonias en las membranas de las muestras --
más contaminadas.

4. PROCEDIMIENTO

4.1. Materiales

Cajas de petri estériles a 5 cm. de diámetro

Pipetas estériles.

Tubos de ensayo

Antorcha de propano

Filtros de 47 mm. con luz de poro de 45 um.

Guantes estériles.

Pinzas estériles para colocar filtros

Equipo de filtración estéril, Millipore o Sarorius

4.2. Reactivos

Gelosa peptonada caseína-soya

p. ej. Trypticase soy agar BBL

Tryptic soy agar DIFCO

Caldo lactosado

p. ej. BIOXON, MERCK

Medio ENDO LES

p. ej. MERCK

BIOXON

Caldo de verde brillante

p. ej. BIOXON

MERCK

4.3. Técnica

Aunque es altamente recomendable que la prueba se efectúe en una campana con flujo laminar, si no se dispone de una, la prueba puede ser llevada a cabo en el laboratorio, siempre y cuando se tomen las precauciones para limitar cualquier otra actividad en el cuarto durante la prueba. Se recomienda uso de guantes estériles para la prueba.

Se deberá emplear solo un vaso del equipo estéril por muestra, aunque el mismo vaso puede ser usado tanto para la filtración de la cuenta total como para la de coliformes de una misma muestra.

El volumen de muestra será de 100 ml. para cada filtro. Si el número de colonias es las placas llegaran a ser muy numerosos para ser contados, se repetirá el análisis reduciendo el volumen de muestra, de manera que las cuentas caigan dentro de un rango fácilmente contable (de 30 a 300 colonias). El volumen mínimo que debe ser filtrado es de 1.0 ml. Si una muestra de 1 ml. resultara aún ser muy numerosa para ser contada, use el método de inoculación directa o prepare diluciones de la muestra (hasta un mínimo de 1.0 ml.) y aplique el método de filtración por membrana.

Si los vasos se ensamblaron sin filtros coloque asépticamente un filtro en la base y ajuste la pinza de sujeción.

Si el volumen a ser probado es de 20 ml. o menos, añada 30 ml. de agua destilada estéril al vaso filtrante.

Asépticamente, vierta 100 ml. de la muestra en el vaso filtrante. Si se va a usar una sola membrana para ambas pruebas (CT y CC), añada el volumen requerido para cada una (100 para CT más 100 para CC).

Vuelva a colocar la tapa al vaso y enciende la bomba de vacío para poder filtrar la muestra.

Cuando se haya completado la filtración, apague el vacío.

En el caso de la muestra para determinación de biocarga, después de filtrar los 100 ml. enjuague con 30 ml. de agua estéril destilada y filtre.

Cuidadosamente desensamble el vaso de la base y use pinzas para remover el filtro. Si se va a usar un sólo filtro para ambas pruebas, CT y CC, asépticamente corte el filtro a la mitad.

Coloque el filtro (o la mitad del filtro) sobre la superficie de una placa de TSA usando un movimiento giratorio. No debe haber ninguna burbuja de aire bajo el filtro cuando es colocado en el medio. Si se usa un sólo filtro para CT y CC coloque la otra mitad en medio ENDO LES y cierre -- las cajas petri.

Si se usa un filtro completo para cada prueba, coloque entonces otro filtro estéril en el soporte del vaso y repita el procedimiento usando medio ENDO LES en lugar de TSA. Selle con cinta el filo de la placa, conteniendo medio ENDO LES, o coloque las placas dentro de una bolsa de plástico cerrada antes de la incubación para lograr elevados niveles de humedad.

Invierta las cajas petri para incubar.

Método de inoculación directa:

Efectúe las diluciones apropiadas de la muestra en agua estéril o salina.

Vierta 1.0 ml. de la dilución en cada una de dos cajas petri estériles, añada suficiente TSA fundido y enfriado a 45-50°C para cubrir adecuadamente el fondo de la placa (aprox. 20 ml).

Gire o imprima un movimiento rotatorio a las cajas para mezclar. Permita que el agar se solidifique. Invierta las cajas para incubación.

Cuenta de Esporas:

Coloque 1000 ml. de la solución de dextrosa al 5% en un recipiente estéril y caliéntela en un baño de agua temperatura - de 80-100°C, Caliente el recipiente conteniendo la solución por 30 mins. después de que el contenido alcance 80°C.

Inmediatamente después de transcurrido el tiempo enfríe el - recipiente con agua fría.

Filtre el contenido total (1000 ml.), del recipiente como se hizo con las muestras para cuenta total y de coliformes, Deposite el filtro en una caja petri con medio TSA.

Coloque una cinta adhesiva al filo de la caja petri o ponga la placa dentro de una bolsa de plástico cerrada antes de incubar, para prevenir que el medio se reseque en forma excesiva.

Invierta la caja para incubación.

Incubación:

Cuenta total: 30 a 35°C por un mínimo de 72 horas.

Cuenta de coliformes: 34.5 a 35.5°C por 22 horas. Si las --

placas no pueden ser leídas dentro de las 24 horas después - de la incubación déjelas incubando más tiempo hasta un máximo de 72 horas. Todas las colonias sobre las placas incubadas más de 24 horas deberán ser resembradas en caldo lactosado (y si es necesario, en caldo de verde brillante) como se describe más adelante.

Cuenta de spora: 30 - 35°C, por un mínimo de siete días.

INTERPRETACION:

Cuenta Total

Cuente y registre el número total de colonias sobre el filtro.

Si el número de colonias es tan grande que no pueda ser contado, intente contar de 5 a 10 cuadrados sobre el filtro, promedie y multiplique por el número de cuadrados que tenga el filtro. Registre la cuenta anotando la palabra Est. de estimado.

Si a las 72 horas, las placas no pueden ser contadas, registre la cuenta de las 48 ó 24 horas, anotando a un lado el - - tiempo de incubación (horas) al que se leyeron las placas.

Cuenta de Coliformes

Cuente y anote sólo el número de colonias de coliformes, -- Las colonias de coliformes tienen un color rosa a rojo obscuro, a veces con un brillo metálico verde dorado el cual pue-

de variar de tamaño desde el centro de la colonia hasta cubrir-la enteramente. Colonias que no presenten las características arriba mencionadas no serán consideradas coliformes.

Si existiera alguna duda sobre si una colonia es o no un coliforme, resiembre la colonia a un tubo con caldo de lactosa o incube a 30 - 35°C, por un mínimo de 22 horas. Si hay gas presente en el tubo de Durham, resiembre a un tubo con caldo de verde brillante y bilis e incube a 30 - 35°C, por 48 horas. Si hubiera gas presente dentro de las 48 horas la colonia se confirma como coliforme.

Cuenta de Esporas

Cuente y anote el número de colonias.

Prepare un frotis teñido al gram de todas las colonias.

Si sólo se observan cocos, levaduras o mohos, reporte la muestra como negativa para formadores de esporas.

Si se llegan a apreciar bacilos o cocobacilos, anote el número total de colonias sobre el filtro. Si la tinción al Gram demuestra que dichas colonias son Gram-negativas, no se requiere mayor evaluación y la muestra se reportará como no formadora de esporas.

Si la determinación de Gram es Gram-positiva o indeterminada, resiembre una colonia en TSA e incube aeróbicamente a -

30 - 35°C. Resiembra otra colonia en TSA e incuba anaeró**bi**camente a 30 - 35°C.

Observe las placas para ver si hay crecimiento después de 45 a 50 horas, proceda como se indica más adelante, después de 5 días de incubación total.

Si no hay crecimiento, resiembra una segunda vez en TSA e incube esta segunda placa y la primera por 5 días. Si hay crecimiento, prosiga como se indica más adelante, si no hay crecimiento, el organismo puede ser considerado no formador de esporas, no se requieren más evaluaciones.

Después de 5 días de incubación examine el crecimiento por microscopía de contraste de fase usando una gota de cultivo y - colocándola sobre un porta objetos, se coloca un cubreobjetos encima de la gota y se examina al microscopio bajo contraste de fase.

Si el cultivo está aproximadamente 90% libre de esporas, proceda como se indica a continuación. Si el cultivo muestra menos esporulación o esporas inmaduras (principalmente dentro - de las células), continúe incubando y reexamine a los diez -- días. Si la esporulación es todavía inadecuada, reicube por un mínimo de 14 días de incubación total desde la incubación original. Si no se observan esporas después de 14 días, la - muestra puede ser liberada como no formadora de esporas. Si hay esporas, se prepara un cultivo en un agar para esporula--

ción y se deberá hacer un estudio de tiempo para muerte térmica, antes de liberar el lote cuya biocarga antes de esterilizar presentaba esporas. Es decir se determinará el valor D para dicho microorganismo, el Valor D_{121} :

- Si el valor D es menos de 0.5 el lote puede ser liberado.
- Si el valor D_{121} es mayor de 0.5 el lote debe ser colocado en Rechazo.

Lo anterior se efectuará sólo en caso de que la muestra exceda el límite de 10 esporas/1000 ml. si no excede el límite, se anotará en el reporte el número de colonias formadoras de esporas encontradas.

CUADRO SINOPTICO

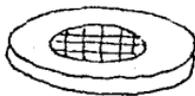
AGUA DESMINERALIZADA
AGUA DESTILADA

↓
100 ml. de muestra

↓
Filtrar por mem-
brana 0.45

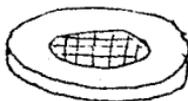
↙ ↘
Cuenta Total
sembrar membrana
en placa de agua
conteniendo
TSA

↙ ↘
Cuenta coliformes
sembrar membrana
en placa de agua
conteniendo
ENDO LES.



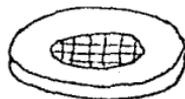
3 0-35°C.

48-72 hrs.



35°C.

24-72 hrs.



30-35°C.

min. 7 día C

BIOCARGA

SOLUCION
DEXTROSA AL 5%

↓
1 000 ml. de muestra

↓
Calentar 80°C.
30 min.

↓
Enfriar con agua helada

↓
Filtrar por membrana
0.45

↓
Cuenta esporas
sembrar membrana
en placa de agua
TSA.

EVALUACION:Muestras Semanales (agua destilada y no destilada)

Si las cuentas exceden los límites especificados en las tablas que se indicaron en la introducción de esta práctica, - lo que se haría en la Industria Farmacéutica es: el sitio - que dió fuera de límites debe ser remuestreado en dos días - consecutivos de trabajo, tomando inicio el día que se supo - d el fuera de límites.

Si el equipo no está en uso (por ejemplo. deionizadores, -- d estiladores, etc.), la muestra debe ser tomada el primer - día que es puesta en servicio y al día siguiente. Si una o - ambas de las repuebas están dentro de límites, no se requie - ren más muestras. Si las tres muestras consecutivas están - fuera de límites, se deberá proceder como se indica en la - parte de "Acciones".

Muestras Diarias de Agua Destilada

Si las muestras exceden los límites especificados en tres -- días consecutivos se procederá como se indica en "Acciones"

Muestras de Soluciones sin Esterilizar (Biocarga)

Cuando se encuentra una cuenta fuera de límites, se deberán - revisar los diez lotes previos. Si más de uno de los diez - lotes previos de este tipo de producto estuvo fuera de lími-

tes, existe una condición de alerta y se deberá llevar a cabo una acción investigadora como se indica más adelante.

ACCIONES

Fuentes de Agua No Destilada

La planta debe limpiar o sanitizar al equipo involucrado de acuerdo a la especificación apropiada o al procedimiento estándar de operación que aplique dentro de los 5 días después de la tercera falla. Después de la sanitización remuestree el sitio en tres días consecutivos para verificar que la condición fue corregida. Si no se corrige se repetirá la limpieza y la sanitización hasta que tres muestras consecutivas den dentro de límites.

Agua de Enfriamiento de los Esterilizadores

Autoclaves con circuito cerrado: cheque todo el circuito de recirculación de la agua de enfriamiento, incluyendo los intercambiadores de calor para posibles fugas. Examine las -- gráficas de temperatura de un circuito cerrado para posibles anomalías.

Autoclaves con circuitos abierto: no se requieren repuebas para cuentas fuera de límites. Si la ocurrencia de las muestras fuera de límites es baja, trate de identificar y corregir la fuente de la cuenta alta.

Fuentes de Agua Destilada

Limpie o sanitice de acuerdo a la especificación apropiada o procedimiento de planta dentro de las 24 horas después de la tercer falla. Si la muestra del día siguiente revela un fuera de límites, repita la limpieza y sanitización dentro de las 24 horas. Si la segunda sanitización no corrige la situación ponga fuera de servicio el sitio en cuestión hasta que sea corregido.

Muestras de Solución sin Esterilizar (Biocarga)

Investigue posibles fuentes de la condición fuera de límites auditando los procedimientos de limpieza del equipo de mezclado y llenado, de manufactura y del personal. Se tomarán muestras microbiológicas del equipo si se requiriera.

5. REGISTRO Y ORGANIZACION DE DATOS

Reporta los resultados de forma que se incluya la siguiente información:

- Sitio de muestreo

- Fecha de muestreo y fecha de análisis

- Volumen probado
- Pruebas realizadas (TC, CC, SC).
- Tiempo de incubación y temperatura
- Resultados de cuenta/volumen probado
- Tinción de Gram, si se requirió
- Disposición (pasa, reanálisis, rechazo)
- Resultados de la muestra de reprueba y documentación --
de la investigación si se requiere.
- Firma de la Persona(s) que realizó(aron) el análisis.
- Firma del supervisor.

6. ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La importancia de esta práctica en sí, radica no en técnica - de filtración por membrana sino más bien en la panorámica que se trata de dar al alumno acerca de lo que ocurre en la industria farmacéutica. Aquí se han dado los lineamientos que más o menos se deben de seguir en un sistema de agua de una fábrica farmacéutica pero debe hacerse notar que cada compañía tendrá sus propias especificaciones, sus propios procedimientos y límites de acuerdo a sus instalaciones, equipo y productos que manufactura. En esta práctica se habló en forma general por lo que es muy posible que el alumno tenga muchas dudas -- por lo cual se recomienda hacer una sesión de preguntas y respuestas en que todos los alumnos participen y el maestro aclare sus dudas, donde se contesten preguntas tales como las que planteo a continuación y donde se clarifiquen algunos términos muy del uso farmacéutico y que no son del dominio de los estudiantes.

¿Qué es autoclave?

¿Qué pasos generales conlleva un proceso de esterilización al vapor?

¿Qué tipo de contaminantes se pueden encontrar más comúnmente en el agua?

¿Qué es un procedimiento estándar de operación?

¿Qué son las Buenas Prácticas de Manufactura?

¿Por qué se deben monitorear los suministros de agua no destilada aunque no se usen directamente en la fabricación?

¿Cuál es la finalidad de un filtro de carbón en un sistema de purificación de agua?

¿Cuál es la finalidad de un filtro o arena?

¿Qué es un deionizador?

¿Qué es un suavizador?

¿En qué consiste un equipo de ósmosis inversa?

¿Cómo se determina el Valor D y explique cual es su importancia?

7. BIBLIOGRAFIA

- Crabbe, D.; A Double pass reverse osmosis system, Industrial Water Engineering, Dec 1976
- Desessa, P.A.; The Generation of Pharmaceutical Grade Water by Distillation. Pharm. Tech. 4: 103-112 (Nov) 1980
- Eisman, P.C.; The Bacteriological aspects of deionized water, J. Am Pharm. Assn.
- Giorgio, R.J. Considerations in the design of hot circulating water for injection systems. Pharm. Tech. 2 : 19-24 (Dec) 1978
- GMP Report. Plant Sanitation Program, Vol 2 No. 2 -- 1981
- Gordon, M.R.; Process Water, Cosmetics & Toiletries, Vol. 98 April 1983
- Heyl, H.; Deionized Water in Pharmaceutical Plants: An assential requirement. Pharmaceutical Engineering, - March/April 1983
- Hill, R. W., Water in the pharmaceuticals and cosmetics industries, Manufacturing Chemist & aerosol news, May 1981, p. 41-43
- Klink, A.E., Artiss, D.H. Good Manufacturing practices for Water; Classes, Methods of Manufacture, Testing requirements and intended uses. J. Parenter. Drug Assn; 32:5 (Sep-Oct) 1978 p. 226-235.
- Kuhlman, H.C., Technical processes in the production of water for inhection; J. Parenteral Science and - Technology, Vol. 35, No. 2, March-April 1981 p. 54-59.

- Nebel, Carl & Theresa; Ozone, the process water sterilant; Pharm, Mfg. April 1984 p 15-23.
- PMA, Proceedings of the PMA Water Seminar Program - Jan-Feb 1982
- Rechen, H.C.; Miller, R.T.; Design Considerations for a Pharmaceutical - grade RO.-DI water purification system; P & M C Industry; Sep-Oct 1983
- Rechen, H.C., The Role of ultrafiltration in the production of pyrogen-free purified water; Pharm Mfg; -- Sep 1984.
- Rechen, H.C.; Water for Injection in device Manufacture; MD & DI, May 1981 p. 37-41, 70-72.
- Scruton, S.H.; Up-grading water purity for manufacturing nonsterile pharmaceutical products. Pharm. Tech. 4: 39-42 (Jul) 1980
- Stadnisky, W.; Reverse Osmosis-Technology and Systems for Water purification. Pharm. Engr.; March-April 1984 p. 34-37
- The Cosmetic, Toiletry and Perfumery Assn.; Recommended microbiological limits & guidelines to microbiological Quality Control; July 1983
- United States Pharmacopeia, USP XXI
- Vlasak, F.J. Production, Storage and Quality of Processed Water, PMA International Technical Committee meeting; September 1981, page 1-10

PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS PARA
ANÁLISIS DE AIRE

1. INTRODUCCION

La limpieza es crítica para la calidad de los productos, para la productividad de la compañía e incluso para nuestra -- propia salud y seguridad.

El término "limpio", significa mucha más que libre de contaminación visible como es el polvo, pelusas, pelo, vidrio, etc. "limpio" también significa libre de contaminantes invisibles tales como microorganismos (bacterias, hongos, virus).

Uno de los principales retos de GMP's (Good Manufacturing -- Practices - Buenas prácticas de manufactura), es entonces defender los productos manufacturados en la industria farmacéu-- tica de ambos tipos de contaminación: partículas y microorga-- nismos.

El acta federal de alimentos, drogas y cosméticos establece la importancia de defender los productos farmacéuticos de la contaminación en sus secciones 402(a) (4), sección 501 (2) -- (A), y sección 601 (a) donde: "Un alimento, droga, equipo o cosmético será considerado adulterado si ha sido preparado, empacado o mantenido en condiciones no sanitarias donde pudo

haber sido contaminado por suciedad o pudo haberse tornado - dañino para la salud". El diccionario establece que algo se ha vuelto contaminado cuando "se ha vuelto impuro o inadecuado por contacto o mezcla con algo sucio o malo, etc."

Poniéndolo de una manera más simple, la contaminación puede ser definida como la presencia de cualquier sustancia no deseable en un sistema o producto.

La contaminación puede presentarse de muchas maneras. Dos de las formas más comunes son: contaminación con partículas y contaminación microbiana.

Contaminación con partículas

Simplemente significa que un producto se ha tornado impuro -- por la presencia de cualquier partícula que no pertenece a él, por ejemplo el polvo, suciedad, pelusas, fibras e incluso el cabello son todas causas potenciales de contaminación con partículas.

La contaminación con partículas presenta tres características que la hacen bastante difícil de controlar:

- 1) La presencia universal de las partículas. Prácticamente todo tipo de material puede degenerar a forma de partícula y ser distribuida a través de toda una planta farmacéutica por las corrientes de aire.

He aquí algunas de las partículas típicas que pueden ser

encontradas en cualquier planta farmacéutica:

TIERRA	POLVO	DESCARGAS DE ESTORNU
POLVO	CABELLO	DOS Y TOS
ARENA	ACEITE	PARTICULAS METALICAS
PELUSAS	FIBRAS	HUMO DE TABACO

- 2) El inmenso número de partículas. El ambiente de una --- planta típica puede contener de 200,000 a 10'000,000 de partículas por pie cúbico de aire.

Para una planta que tenga cerca de 1'000,000 de partículas por pie cúbico de aire, la remoción del 99% de las - partículas por filtración todavía dejaría un residuo de 1,000 partículas por pie cúbico de aire, que serían causa potencial de contaminación de producto.

- 3) El amplio rango de tamaño de partícula. Algunas partículas pueden ser obseradas a simple vista mientras otras - deben ser detectadas y analizadas con equipos e instru--mentos de medición muy sensitivos, incluso algunas partílculas necesitan ser examinadas bajo microscopio.

Estas tres características son las que hacen de la contaminación con partículas, una constante amenaza para la - calidad de los productos.

Contaminación Microbiana

Como ustedes saben, es causada por la presencia de microorganismos, los cuales tienen la capacidad de multiplicarse rápidamente y con ello ocasionar que los productos manufacturados en una planta farmacéutica se conviertan en dañinos para la salud.

Los microorganismos forman parte normal de nuestra vida diaria, están con nosotros dondequiera, en el aire, el agua, el suelo e incluso en nosotros mismos.

Si los microorganismos tienen los nutrientes necesarios, la adecuada cantidad de humedad y la adecuada temperatura, se pueden multiplicar muy rápidamente, tan rápidamente que sólo una bacteria puede producir otras 281 billones en sólo 24 horas.

Muchos de los microorganismos son útiles para los seres humanos ya que se usan en la manufactura de antibióticos productos alimenticios de consumo diario y en las bebidas alcohólicas.

Sin embargo, es un hecho que algunos tipos de bacterias pueden causar enfermedades e incluso la muerte. El género Salmonella es un buen ejemplo. La Salmonella puede causar fiebre Tifoidea o enfermedades intestinales serias, las cuales pueden ser fatales.

Dado que no es inusual encontrar algunos de estos tipos

de bacterias en el ambiente normal de una planta, se deben proteger los productos de la contaminación estableciendo un programa de sanitización que pregenga el que los microorganismos puedan obtener los nutrientes necesarios, la humedad requerida y la temperatura adecuada para reproducirse y multiplicarse. Por ejemplo un sistema de transporte de líquidos conectado a un tanque y a una línea de llenado y empaque puede rápidamente llegar a estar contaminado con bacterias - a menos que sea adecuadamente limpiado y guardado de acuerdo a un procedimiento escrito.

Es necesario recordar que el grado de "limpieza o contaminación" de un sistema o producto no puede ser siempre definido.

Siempre hay algo de contaminación en cada objeto que manejamos, en el aire que respiramos, en el agua que bebemos.

Las partículas y los microorganismos están presentes en cada sistema de cada planta y pueden potencialmente contaminar -- los productos que se manufacturan.

Existen cuatro vehículos mayores portadores de contaminación:

AIRE

AGUA

SUPERFICIE

GENTE

El motivo de esta práctica es precisamente acerca del vehícu-

lo número 1, el AIRE.

El aire está alrededor de nosotros, lo respiramos a un promedio de 12 a 20 veces por minuto. Sin él no podemos vivir, - las plantas no pueden crecer, el fuego no ardería y nosotros algunas veces no reparamos en él porque no podemos verlo.

El "AIRE" se define como una mezcla invisible de gases (nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, dióxido de carbono, argón, helio, etc), el cual rodea a la tierra.

En esta práctica nosotros vamos a definir al aire como un vehículo para la contaminación.

El aire no es un medio en el cual la contaminación pueda -- crecer. Sin embargo, es un peligro acarreador de contaminación. El polvo y las minúsculas gotas de agua, las cuales - pueden estar contaminadas con microorganismos, son las fuentes primarias de contaminación que usan al aire como un vehículo para atacar los productos que se manufacturan en una -- planta farmacéutica.

Por ejemplo, gotitas de agua contaminadas están constantemente siendo introducidas en nuestro lugar de trabajo provenientes de nuestra tracto respiratorio cuando tosemos, hablamos o estornudamos.

Por esa razón todas las plantas farmacéuticas deben examinar todas las variadas formas en las que el "aire" puede aca---

rear contaminación. Se debe controlar y filtrar el aire de forma en que se minimize la probabilidad de contaminación -- del producto.

¿Cómo se controlan los contaminantes del aire en la industria farmacéutica?. ¿Qué tan "limpio" debe ser ese aire?. - Bien, las respuestas a esas dos preguntas dependen principalmente del tipo de productos que se manufacture en la planta farmacéutica. Sin embargo, aquí expondremos brevemente unos pocos métodos para controlar los contaminantes en el aire.

AREA LIMPIA

Uno de los métodos es llamado Area Limpia o Cuarto Limpio. - Una área limpia es un área cerrada que controla la materia - particulada presente en el aire.

Esta es la estrategia más eficiente para defender los productos de la contaminación proveniente del aire.

El estándar federal 209B, "Requerimientos de áreas limpias y estaciones de trabajo con ambiente controlado", es un documento importante para entender los principios de un área limpia y nos proporciona una base para comparar los grados de control de partículas sin importar el diseño del ambiente -- limpio.

Las áreas limpias diseñadas bajo las normas del estándar deben ser capaces de cumplir al menos una de las siguientes cla

ses:

CLASE 100 - El conteo de partículas no excede 100 partículas por pie cúbico de un tamaño de partícula de 0.5 micrones o más grandes.

CLASE 10,000 - El conteo de partículas no excede un total de 10,000 partículas por pie cúbico con un tamaño de partícula de 0.5 micrones o más grandes.

CLASE 100,000 - El conteo de partículas no excede en total de 100,000 partículas por pie cúbico con un tamaño de partícula de 0.5 micrones o más grande.

FILTRACION

Es la base del control ambiental, la remoción de partículas del aire, es usualmente llevada a cabo por filtración, precipitación electrostática o por lavado del aire (donde el aire es pasado a través de una regadera de agua). La filtración es el medio más eficiente de controlar la calidad del aire. Es el bloque básico de construcción sobre el cual el concepto total del control ambiental se levanta. Una compañía farmacéutica debe contar con personal que tenga la comprensión básica de los principios de filtración, grados de filtro y capacidades, así como métodos para comparar el desempeño de diversos filtros.

Por ejemplo, uno de los más comunes sistemas de filtración - de aire es el que produce un flujo laminar.

Un sistema de flujo laminar es el que define como aquel en el cual el aire entero dentro de un área confinada se mueve con una velocidad uniforme a lo largo de líneas paralelas de flujo. Los sistemas de flujo laminar son capaces de lograr áreas limpias clase 10,000 y clase 100. Este tipo de sistema es muy usado en el llenado aséptico de inyectables y de otras formas farmacéuticas que requieren ser tratadas bajo un ambiente controlado.

En los sistemas de flujo laminar se usan filtros HEPA (high - efficiency particulate air) los cuales tienen un índice de -- eliminación de partículas extremadamente alto (con eficien-- cias mayores de el 99.97%).

En adición a su eficiencia, el comportamiento de un filtro -- está influenciado por su capacidad para retener partículas -- después de su deposición y por su capacidad de retener polvo.

De otra forma la rápida obstrucción del filtro, aunque fuera altamente eficiente, lo haría inadecuado.

Las características del filtro que afectan la retención y la saturación del mismo son:

- 1) El tipo de filtro (monofilamento vs. alta vap)

- 2) El diámetro de la fibra (mayor área superficial)
- 3) El ensamble de las fibras (un filtro de tela coherente se satura más rápidamente que un filtro de tela mate -- floculenta).
- 4) La porosidad del ensamble de la fibra (compare el filtro de extractor de una cocina contra un filtro industrial de alta eficiencia).
- 5) La profundidad media del filtro (el aumento en la profundidad mejora la probabilidad para la deposición por inercia, difusión, interrupción, etc.)

En la industria farmacéutica se usa así mismo aire comprimido para ciertas máquinas y ciertos usos, como son las sopleadoras. Recordemos una vez más que las partículas de polvo presentes en el aire contienen microorganismos. Por ello es muy importante en cualquier compañía farmacéutica efectuar un monitoreo constante tanto del aire ambiental como -- del aire comprimido que se usa en la planta y que está en -- contacto directo con el producto.

2. OBJETIVOS

En esta práctica el alumno será capaz de definir las muestras de aire que requieren ser analizadas para determinación de la calidad microbiológica y conocerá los procedimientos -- para el muestreo con sus correspondientes métodos de prueba.

En esta práctica se dan los lineamientos generales para el análisis microbiológico del aire. Donde luego en cada compañía farmacéutica los procedimientos pueden variar de acuerdo al tipo de medicamentos que produzca y dependiendo de las instalaciones que tenga.

3. HIPOTESIS

Como el aire es uno de los principales vehículos de contaminación (microbiana y de partículas) al exponer placas con medio nutriente durante un tiempo determinado, los microorganismos caerán por gravedad (placas de exposición) o por efecto de la succión (muestreador) y se observará crecimiento proporcional al grado de contaminación presente, se observará mayor número de colonias si el aire está muy contaminado y menor número de colonias si el aire está más limpio.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Material:

Muestreador de aire comprimido

Medidor de flujo marca Dwyer MMF-100 PV, Dwyer VFB-67 6

Dwyer de las series RMB o equivalente.

Muestreadores de aire ambiental. Use uno de los siguientes:

- Slit air sampler, New Brunswick Scientific Model STA-203 ó STA-303. Use cajas petri de 150 x 15 mm. con agar TSA Anderson reusable two stage air sampler, model 10-850. Use cajas petri de 100 x 15 mm. con agar TSA.
- Casella Bacteria Sampler MK II. Use cajas petri de 100 x 15 mm. con agar TSA.
- Biotest RCS centrifugal air sampler (article # 940010), Folex biotest-Shluessner Inc., calibrado según las instrucciones del fabricante.

Placas de exposición. Use placas de petri de 100 x 15 mm. con agar TSA.

4.2. Medio cerebro-corazón o NaCl 0.9%. (dependiendo del método usado)

Gelosa con peptona digerida de Caseína-Soya

p. ej. Trypticase soy agar (BBL)

Tryptone soy agar (OXOID)

Tryptoc soy agar (DIFCO)

Gelosa con peptona de caseína y peptona de harina de soya MERCK

4.3. Sitos de muestreo:

Aire comprimido

Una muestra al mes en la cabeza principal del filtro -- primario de distribución. Límite - 0 UFC/10 ft³.

Una muestra al mes de cada punto en donde haya contacto con el producto y en cada esterilizador de vapor. Límite = 10 UFC/ft³.

Después de la instalación del filtro primario y de la -- prueba de integridad (filtro nuevo o chequeo anual) se requiere una muestra aceptable antes de liberar el sistema.

Aire Ambiental

Cada cuarto de llenado y mezclado (para productos etiquetados como estériles): una muestra a la semana. Límites por procedimiento estándar de operación basados en normas establecidas.

Otras áreas microbiológicamente controladas en la planta. Cada área una vez al mes. Límites por procedimiento estándar de operación basados en normas establecidas.

Laboratorio donde se realiza prueba de esterilidad: una vez al mes. Límites por procedimiento estándar de operación basados en normas establecidas.

Campanas de flujo laminar y de llenado aséptico: una muestra a la semana. Límite - 1 UFC/10 ft³ ó 20 UFC/ placa de exposición (total de todas las placas usadas).

Se requiere calificación para las siguientes instalaciones o modificaciones. Las muestras deben estar dentro de límites en tres días consecutivos o en 4 de 5 muestras:

- Nuevas áreas microbiológicamente controladas en complejos de mezclado-llenado.
- Modificaciones las cuales puedan afectar la calidad microbiológica del suministro de aire (p.ej. cambio de filtro).

Procedimiento de muestreo para aire comprimido:

Se deberán usar anteojos de seguridad a través de todo el procedimiento.

Si el medio o la solución salino no fueron esterilizados en el muestreador de aire comprimido, asépticamente transfiera 30 ml. al muestreador (ver figura 1 para dibujo del muestreador).

Desinfecte con flama el sitio de muestreo. Si la desinfección con antorcha no es práctica, desinfecte profundamente el sitio de muestreo usando un trozo de tela li

bre de pelusas y alcohol al 70% o isopropanol (el cual haya sido filtrado a través de membrana de 0.45 mm. de poro y guardado asépticamente).

Parcialmente abra la válvula de aire comprimido para - obtener suficiente flujo de aire para efectuar la prueba.

Permita fluir el aire por cerca de un minuto antes de - muestrear.

Con el aire todavía fluyendo, reflamee la conexión.

Cuidadosamente remueva el papel del tubo lateral y asépticamente conéctele al medidor de flujo. Coloque una - pinza de control de flujo a uno de los brazos del conector en "Y".

Conéctele el otro brazo del conector en "Y" (tubo de entrada) al sitio o salida de aire comprimido que se va a muestrear.

Lentamente cierre la pinza controladora de flujo, hasta obtener un flujo de $1 \text{ ft}^3/\text{min.}$ y muestree durante 10 minutos, o si se usa el muestreador Millipore, ajuste el - flujo a 12.5 litros/min. y muestree por 23 minutos.

Después de que haya transcurrido el tiempo de muestreo, coloque una pinza en el tubo de entrada e inmediatamente

te retire el tubo de la salida de aire comprimido, cierre el tubo de salida y cierre el suministro de aire.

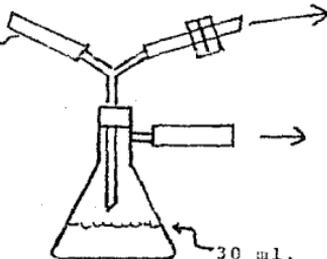
Para sitios de muestreo que muestran una historia consistente de no crecimiento se puede incubar el muestreador completo de 30-35°C, por no menos de 72 horas (siempre y cuando se haya usado el medio cerebro corazón).

Alternativamente se puede filtrar el medio o la solución salina a través de una membrana de 0.45 mm. enjuague el muestreador con medio o con agua estéril o con solución salina estéril y filtre a través del aparato de filtración apropiado. Incube de 30-35° C. durante 72 horas.

Después de la incubación observe las placas para ver si hay crecimiento y reporte como cuenta total por 10 pies cúbicos de aire.

Tubo de entrada

Conectar a la salida del aire comprimido.



Tubo de salida

con pinza controladora de flujo.

Al medidor de flujo

de medio cerebro corazón o solución salina.

FIGURA No. 1

Procedimiento de muestreo para aire ambiental

Usando muestreador de aire ambiental

Sature una servilleta de papel con alcohol al 70% y limpie la superficie interior de la cubierta de plástico, la superficie de la tornamesa y la salida de la rejilla del muestreador.

Coloque y cierre la cubierta dentro de posición. Conecte -- el muestreador a una bomba de vacío usando el tubo de latex apropiado.

Coloque o ajuste el ciclo de rotación para 60 minutos.

Encienda la bomba y ajuste el flujo con la válvula de aguja a 1 pie cúbico por minuto y permita que fluya por uno o dos minutos.

Remueva la cubierta (tapa) de la caja petri de 150 x 15 con agar TSA y coloque la caja petri en la tornamesa.

Vuelva a colocar la cubierta del muestreador a ajústela en posición.

Eleve la tornamesa para asegurar que el agar se encuentra a la distancia apropiada de la ranura (rejilla)

Ajuste el controlador de tiempo para 60 minutos.

Después de que haya transcurrido aproximadamente la mitad -- del tiempo de muestreo, mueva el muestreador a otra --

localización dentro de la habitación.

Cuando el período de muestreo se haya completado, haga descender la tornamesa, quite la cubierta del muestreador, retire la caja petri y tápela.

Incube la caja petri a 30-35° C por un mínimo de 72 horas.

Observe después de 24 y 48 horas. Cuente a 24 y 48 horas si anticipa que puede haber sobrecrecimiento.

Reporte las cuentas de microorganismos por pie cúbico de aire.

Usando Placas de Exposición

Exponga placas de agar con TSA de 100 x 15 mm. en la habitación que se va a monitorear durante una hora. El número de cajas petri y la localización dentro de la habitación debe estar establecido en un procedimiento estándar de operación de la planta farmacéutica. Las placas de exposición deben estar colocadas de manera que estén completamente libres al ambiente.

(Por ejemplo colocarlas bajo equipos, anaqueles, etc. y donde no vayan a ser fácilmente pisadas o salpicadas con agua).

El tiempo de exposición puede ser reducido si la expe--

riencia muestra que los resultados de una hora arrojan cuentas de incontables.

Incube las placas de agar a 30-35°C. por un mínimo de 72 horas. Observe después de 24 y 48 horas. Cuento a 24 y 48 horas si anticipa que puede haber sobrecrecimiento. Cuentas estimadas se considerarán aceptables sólo si la cuenta de 72 horas no es cuantificable.

Evaluación y acciones

Aire ambiental

El propósito de cuentas microbiológicas de aire es el determinar, el grado de contaminación a la cual el productos están expuestos.

Los límites para cada área deben ser establecidos por un procedimiento estándar de operación de la planta de acuerdo a las necesidades e historial de la planta. Si dichos límites son excedidos y confirmados con una muestra de reprobación, se deberá llevar a cabo una investigación. Los filtros de aire deberán ser inspeccionados, se deberán evaluar los procedimientos de limpieza y se investigarán otras posibles fuente de contaminación.

Aire comprimido

Si se encuentra una cuenta que excede los límites establecidos, inmediatamente repita la prueba, si ambas están fuera de límites el filtro microbiológico deberá -- ser reemplazado dentro de las siguientes 24 horas. Después de la instalación del filtro, repita la prueba para asegurar que la condición ha sido corregida. Si el reanálisis está dentro de límites, el sistema puede ser liberado.

En esta práctica se deja a criterio del alumno el muestrear un sitio donde haya una toma de aire comprimido, así como el colocar placas de exposición en algún salón de clases, en algún laboratorio, en el metro, etc., para que se familiarice con los métodos ya que no va a ser posible que lo haga en un sistema real de la industria. Aquí se pretende que se entere de lo que pasa en una planta farmacéutica y que conozca los métodos, aunque los ensayos que se realicen en las áreas elegidas -- por él no sean áreas de ambiente controlado.

5. REGISTRO Y ORGANIZACION DE DATOS

Reporte los resultados de forma que se incluya la siguiente información:

Sitio de muestreo

Fecha de muestreo y fecha de prueba .

Volumen probado

Tiempo de incubación y temperatura

Resultados

Disposición: Pasa - Falla - Reanálisis

Firma de la persona que realizó la prueba

Firma de la persona que verificó

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

La importancia de esta práctica, al igual que la anterior, radica en que se tratan de dar los lineamientos al alumno -- sobre los requerimientos de aire comprimido y aire ambiental (como sistemas) en una planta farmacéutica. Se trata de dar una visión de las razones que hacen necesario un monitoreo -- de aire en un lugar donde se manufacturan medicamentos con -- fines de validación y de saber el grado de contaminación al que están expuestos los productos, ya que es el monitoreo -- constante lo que hace y garantiza que dichos productos no -- van a ser dañinos o perjudiciales para los pacientes.

Se recomienda hacer una sesión de preguntas con el maestro para hacer más claros algunos conceptos en los que haya quedado duda.

¿Qué es un filtro HEPA?

¿En qué casos se usan áreas de ambiente controlado?

¿Cuál es la diferencia entre aire ambiental y aire com
primido?

¿Cómo es posible medir la cantidad de partículas por -
pie cúbico en un área?

7. BIBLIOGRAFIA

- Abdou, M.A.F; Determination of airborne microorganisms in a Pharmaceutical plant using standard, elective and selective culture media. Pharm. Tech. 4: 93-100 (Nov.) 1980
- Barclay, D.L.; Developing a clean room garment program MD & DI June 1983
- Buogo, A.; Tentative Method for the qualitative detection and quantitative assessment of air contamination by drugs. Applied Microbiology June 1972
- Carlberg, D. M.; The microbiological assessment of -- Bioclean-room Quality. Pharm. Mfg Nov. 1984
- Dell, L.A.; Aspects of microbiological monitoring for non-sterile and sterile manufacturing environments. - Pharm. Tech. 3: 47-51 Aug 1979
- Delmore, R.P. and W.N. Thompson; A comparison of air-sampler efficiencies; MD & DI Feb 1981 p. 45-48
- De Visser, A.D. Microbiological aspects of an environmental program p. 70-81; Pharmaceutical manufacturers association. Proceedings of the second PMA seminar program on validation of sterile manufacturing processes: Aseptic Processing. Atlanta Georgia, March 1979
- Panel discussion: Environmental sampling in a aseptic environment; Bull. Parenter. Drug Assn. 28:6 (Nov-Dec) 1974 p. 253-269
- Fried, E. ; Environmental controls- A systems engineering approach. MD & DI 1:1; June 1979; p. 45-49

- General Services Administration. Federal clean-room - and workstation requirements, controlled environment. April 24, 1973 p. 1-35
- GMP report; Plant sanitation program; Vol 2 No. 2, - 1981
- Hepa filters (Recommended practice) Institute of Environmental Sciences Nov 1983
- Laminar Flow Clean Air devices; Recommended Practice; Institute of Environmental Sciences Nov 1983
- La Rocca, P.T.; Testing requirements for HEPA filters and clean work stations. Pharm. Mfg.; March 1985
- Morhard, W.H.; Designing for the environmental control of pharmaceutical manufacturing facilities. Pharm. - Engineering Nov-Dec 1983.
- Seeger, G.A.; Clean-room standards- Good manufacturing practices and Federal standard 209-B - A comparison.
- Sorensen, R. L.; F.S. 209-B: A part of total environmental Control Pharm. Eng.; Nov-Dec 1984

PRACTICA # 4

DETERMINACION DE LA POTENCIA DE UN ANTIBIOTICO

DETERMINACION MICROBIOLOGICA DE LA ACTIVIDAD DEL ANTIBIOTICO

RIFAMPICINA

METODO TURBIDIMETRICO

1. INTRODUCCION

Tradicionalmente los antibióticos están definidos como sustancias químicas producidas durante el metabolismo de algunas especies de microorganismos (tales como hongos, actinomicetos y bacterias), que poseen la propiedad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, llegando incluso a destruirlos. Sin embargo, en la actualidad no es tarea fácil establecer los límites para el término "antibiótico". Aunque tradicionalmente los antibióticos han sido diferenciados de los agentes quimioterapéuticos, la síntesis química de nuevos antibióticos ha oscurecido la distinción. Así mismo el término "antibiótico" había sido usado para incluir sustancias producidas por microorganismos sin embargo, el desarrollo reciente de agentes antibacterianos obtenidos de fuentes vegetales y animales ha oscurecido la distinción también. Más aún, el concepto de que los antibióticos son antagonistas del crecimiento o vida de microorganismos se ha

extendido ahora como antagonismo hacia el desarrollo celular en general con el advenimiento de los antibióticos antitumorales.

Con el descubrimiento de los antibióticos se inició una nueva era en la historia de la humanidad desde 1942, en que la terapia basada en el uso de antibióticos se hizo una realidad con la penicilina. Desde entonces se ha experimentado un descenso enorme en la incidencia y mortalidad de un sinnúmero de enfermedades infecciosas ante las cuales nada podía hacer la quimioterapia.

Hoy en día el número de antibióticos se extiende a cientos, sin contar con el gran número de ellos que no pasó de su etapa de investigación por no ser adecuados para la terapia en seres humanos.

Los antibióticos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas así como en su espectro antibacteriano y su mecanismo de acción.

Las propiedades deseables en un antibiótico utilizable para la práctica clínica están bien delineadas: el compuesto debe exhibir actividad antimicrobiana, selectiva y potente, de preferencia contra una amplia gama de microorganismos. Debe ser bactericida en lugar de bacteriostático, operar de forma independiente de los mecanismos de defensa del paciente y no debe inducir resistencia bacteriana significativa. Debe ex-

hibir una proporción terapéutica satisfactoria tanto para -- uso agudo o crónico, es decir que, en el caso de que se requiera usar grandes dosis por largos periodos debe causar -- muy pocos o ningún efecto colateral de importancia. El anti biótico no debe actuar como agente sensibilizante o perturbador de los órganos vitales o sus funciones.

Su eficacia antibacteriana no debe ser materialmente reducida por los fluidos del cuerpo, exudados, plasma, proteínas y enzimas tisulares. Su solubilidad en agua y estabilidad a temperatura ambiente tanto en solución como en estado seco -- son las características altamente deseables. Es una gran -- ventaja el que posea eficacia de administración por varias -- rutas, particularmente la vía oral. Las características de absorción, distribución y excreción deben ser tales que los niveles bactericidas en la sangre, tejidos, fluidos del cuerpo, incluyendo el fluido cerebro-espinal sean rápidamente alcanzados y mantenidos por periodos prolongados, por ejemplo, la excreción del antibiótico en la orina a concentraciones bactericidas es de gran valor en el tratamiento de las infecciones del tracto urinario, además no debe provocar lesión renal o de otro tipo como resultado de dicha excreción. El antibiótico, aún en el caso de que no sea totalmente efectivo cuando se usa sólo en ciertas infecciones, deberá exhibir una o más acciones sinérgicas cuando se combina con otros -- agentes quimioterápicos. Finalmente, debe ser capaz de ser

manufacturado en cantidades adecuadas y a un costo razonable.

No todos los efectos de la terapia con Antibióticos en el hombre son saludables. Cada agente tiene su espectro particular de toxicidad y todos ellos pueden causar alteraciones en la flora bacteriana normal lo cual puede acarrear infecciones superpuestas. Estos problemas están relacionados con cada antibiótico y en cada uno de forma particular. La terapia en "combinación" de dos o más agentes antibióticos no siempre resulta válida y puede dar lugar a antagonismos.

El fenómeno de "resistencia bacteriana" adquirida que se origina ya sea a través de un contacto único del germen con el antibiótico o bien como resultante de un proceso de adaptación provocado por el uso clínico continuado de antibióticos (dando como consecuencia la aparición de cepas mutantes resistentes) es un riesgo siempre presente cuando se usan antibióticos al que se le debe dar considerable atención. El uso indiscriminado de antibióticos es deplorable por lo que su uso debe ser bajo control médico.

Existen muchas clasificaciones de antibióticos (ver figuras 1 a 3) basadas en su fuente de obtención, otras en su naturaleza química, en su espectro de acción, etc.

De la misma manera su mecanismo de acción también varía. En algunos casos inhiben las enzimas que originan la formación

de la membrana celular de las bacterias (como en el caso de la penicilina), en otros interfieren las enzimas de varias - reacciones del metabolismo intermedio o impiden por el mismo mecanismo la síntesis de proteínas (el caso de la estreptomina).

TABLA 1

<u>Fuentes de Algunos Antibióticos Seleccionados</u>	
Mohos	Actinomicetos
Penicilinas Cefalosporinas Griseofulvina	Aminociclitol Aminoglicosido Tetraciclinas Cloranfenicol Macrolidas Cefamicinas Polienos Vancomicina Cicloserina
Bacterias	Organismos Superiores
Polimixinas Bacitracina Gramicidina	Iridimirmecina Allicina Rafanina Vincristina Vinblastina Emetina Quinina

TABLA 2

<u>Clases Químicas de Antibióticos con</u> <u>Ejemplos Representativos</u>	
1. BETA-LACTAMAS Penicilinas Cefalosporinas Cefamicinas	5. MACROLIDOS Eritromicina
2. TETRACICLINAS Tetraciclina Demeclociclina	6. POLIPEPTIDOS Polimixina Bacitracina
3. CHLORANFENICOL	7. POLIENOS Nistatina Anfotericina B
4. AMINOCICLITOL AMINOGLICOSIDOS Gentamicina Estreptomina	8. DIVERSOS Lincomicina Cicloserina

TABLA 3

<u>ESPECTRO DE ACTIVIDAD DE ALGUNOS ANTIBIOTICOS SELECCIONADOS</u>	
<u>Activos principalmente contra bacterias gram-positivas:</u>	
Penicilinas Bacitracina	Vancomicina Macrolidos
<u>Principalmente activos contra bacterias gram-negativas:</u>	
Polimixinas	
<u>Activos contra varias bacterias gram-negativas y gram-positivas:</u>	
Tetraciclinas Cloranfenicol Aminociclitol Aminoglicosidos	Cefalosporinas Sulfas Cefoxitina
<u>Activos contra ciertas bacterias anaerobias:</u>	
Chloranfenicol Cefoxitina Penicilinas	Clindamicina Tetraciclina
<u>Activos en contra de micobacterias:</u>	
Aminociclitol Aminoglicosidos	Cicloserina Rifampina
<u>Activos contra protozoarios:</u>	
Emetina	Quinina
<u>Activos contra hongos:</u>	
Amfotericina B Griseofulvina	Nistatina Natamicina

Activos contra tumores:

Vincristina
Daunorubicina
Mitramicina
Bleomicina
Vinblastina

El número de microorganismos sensibles a la acción de un antibiótico se denomina "Espectro de acción". Hay antibióticos de acción limitada como la estreptomycin; en otros, en cambio es muy amplio como el del cloranfenicol y las tetracinas.

La producción de antibióticos es una de las principales actividades de la actual industria farmacéutica; excepto el clo-ranfenicol que suele obtenerse por síntesis, los demás antibióticos en general se consiguen sembrando los microorganismos productores en medios de cultivo dispuestos en grandes tanques cerrados y aireados intensamente. Para aumentar la producción, se seleccionan cepas altamente productoras y se disponen en los medios de cultivo, precursores de los antibióticos, que también aumentan la producción. Los antibióticos se valoran por unidades establecidas de acuerdo con un patrón aceptadas internacionalmente.

Además de la utilización clínica, los antibióticos tiene numerosas aplicaciones industriales, como antisépticos, en la alimentación de ganado, para combatir plagas, etc.

La actividad (potencia) de los antibióticos puede ser demostrada bajo condiciones adecuadas, por su efecto inhibitorio sobre los microorganismos.

Una reducción en la actividad antimicrobiana también revelará sutiles cambios no demostrables por métodos químicos. En base a ello los ensayos microbiológicos o biológicos permanecen todavía como el estándar para resolver dudas con respecto a la posible pérdida de actividades.

En general se usan dos métodos principalmente para la determinación de la potencia en antibióticos.

En esta práctica conoceremos el método turbidimétrico, en el cual mediante la inhibición del crecimiento de una cepa testigo, se compara la sustancia problema con un patrón de actividad conocida. Se diluye la sustancia problema a la concentración media de la curva patrón y se lee directamente la actividad en curva patrón. Para la apreciación de las relaciones entre la actividad y la concentración, se mide fotométricamente la extinción del líquido de cultivo a 578 nm. para el caso de Refanpicina.

2. OBJETIVOS

Establecer los métodos para la determinación de la potencia de un antibiótico.

El alumno será capaz de:

- Determinar la potencia de un antibiótico por el método de turbidimetría.

3. HIPOTESIS

El método turbidimétrico depende de la inhibición del crecimiento de un cultivo microbiano en un medio fluido, el cual se sabe favorece el rápido crecimiento del microorganismo - en ausencia del antibiótico, como la concentración del antibiótico es inversamente proporcional a la turbidez producida, entonces:

Los tubos con mayor cantidad de antibiótico presentarán un menor crecimiento, por lo tanto mostrarán menor turbidez, en tanto que los tubos con menor cantidad de antibiótico presentarán mayor crecimiento y en consecuencia mayor turbidez.

Si el producto analizado realmente tiene la potencia declarada en la etiqueta, mostrará una turbidez semejante a la de la concentración media de la curva patrón.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1 Materiales

- Fotómetro
- Celdas para fotómetro de 1 cm. de espesor
- Baño María con dispositivo agitador
- Jeringa manual de repetición de 10 ml. (p. ej. marca Cornwall)
- Tubos de ensayo con tapa metálica de 16 x 150 mm.

Matraces aforados, pipetas

4.2 Reactivos:

Medios de cultivo y tampón:

Preparar los medios de cultivo que a continuación se indican a partir de medios desecados y estandarizados. Estos se pueden obtener también como medios desecados y listos para su uso, p. ej. en la firma BBL (Baltimore Biological Laboratory, E.U.) o en la firma DIFCO (DIFCO Laboratories; Detroit, Michigan; E.U.)

Medio A (Antibióticos medio 1)

Peptona	6 gr.
Caseína digerida pancreáticamente	4 gr.
Extracto de levadura	3 gr.
Extracto de carne	1.5 gr.
Glucosa 1.0 gr.	
Agar	15.0 gr.
H ₂ O dest. c.s.p.	1000.0 ml.
pH tras esterilización	6.6 ± 0.1
Esterilización	15 minutos a 121°C

Medio B (Antibióticos medio 3)

Peptona	5.0 gr.
Extracto de levadura	1.5 gr.
Extracto de carne	1.5 gr.

Cloruro de sodio	3.5 gr.
Dextrosa	1.0 gr.
Fosfato dipotásico	3.68 gr.
Biofosfato de potasio	1.32 gr.
H O dest. c.s.p.	1000.0 ml.
pH tras esterilización	7.0 \pm 0.05
Esterilización	15 minutos a 115°C

Ajustar el pH con NaOH 1 N. o con HCl de forma que después de esterilización corresponda al especificado.

Tampón de fosfatos de pH 7:

KH PO	3.52 gr.
Na HPO .12H O	14.62 gr.
H O dest. c.s.p.	1000.0 ml.
Esterilización	20 minutos a 121°C

Cepa testigo

Escherichia coli ATCC 10536

Inocular cada dos semanas la cepa testigo sobre - el medio A en tubos de agar inclinados, incubar - de 18 a 24 hrs. a una temperatura comprendida entre 32 y 35°C, conservar a 4-6°C.

Formaldehido: el necesario para detener el crecimiento después del período de incubación.

4.3 Reactividad y toxicidad de sustancias:

Formaldehido: Provoca irritación de ojos, nariz; evítase el contacto con la piel ya que provoca -- quemaduras dérmicas.

4.4 Técnica:

Estandarización de la suspensión a inocular.

Poner en suspensión el cultivo de un tubo de agar inclinado que contiene el medio A con unos 3 ml - de solución fisiológica estéril de cloruro sódico y según convenga, inocular con ello un frasco de Roux p.ej. (con 300 ml del medio A). Al cabo de 24 hrs. de incubar a 37°C poner los gérmenes en - suspensión en 50 ml de solución fisiológica estéril de cloruro sódico y, acto seguido, conservar en el frigorífico (estable durante 14 días).

Estandarizar esta suspensión a inocular, para el uso diario, en el fotómetro a 546 nm en celdas de 1 cm de espesor hasta el 15% de transmitancia, -- con respecto al valor en blanco (= 100% de transmitancia) empleando una solución fisiológica estéril de cloruro sódico.

Inocular el medio B con una suspensión al 0.7% recien preparada o bien con una suspensión al 1.0% preparada 14 días antes.

Curva Patrón

Para establecer la curva patrón utilizar las siguientes concentraciones finales de Rifampicina/s.a.: 0.148, 0.200, 0.270, 0.364, 0.492 ug/ml.

La concentración de 0.270 ug/ml sirve como dilución de referencia para la prueba.

Pesada y dilución del Patrón

Conservar el estándar en un recipiente bien cerrado, protegido de la luz, en el frigorífico a 5-7° C.

Aproximadamente 1 hora antes de efectuar la pesada, colocar el recipiente a temperatura ambiente. Pesar con exactitud en un matraz aforado estéril 50 mg. de RIFAMPICINA/s.a., disolver con 10 ml de dimetilsulfoxido y diluir con tampón de fosfatos de pH 7.0 hasta obtener una concentración de 10 - ug/ml. A partir de esta solución madre, preparar con tampón de fosfatos de pH 7.0, en matraces aforados de 10 ml, las diluciones intermedias siguientes:

Tabla de DiluciónDe la solución madre
de 10 ug/ml, tomar:

Diluir un tampón

Concentración final de la
dilución intermedia.

ml	ml	ug/ml
1.48	c.s.p. 10	1.48
2.00	c.s.p. 10	2.00
2.70	c.s.p. 10	2.70
3.64	c.s.p. 10	3.64
4.92	c.s.p. 10	4.92

Repetiendo cuatro veces la operación, pipetar 1 ml de cada una de las diluciones intermedias en tubos de ensayo y agregar cada vez mediante la jeringa de repetición Cornwall, 9 ml de caldo inoculado (Medio B). Emplear también las dos concentraciones extremas (máxima y mínima) como controles para determinar el momento óptimo en que ha de interrumpirse la incubación. Con estas dos concentraciones llenar 5 tubos en lugar de 4.

Dilución de la prueba:

Comprar en una farmacia Rimactan jarabe al 2% o cualquier otro producto que contenga Rifampicina como sustancia activa y diluir hasta la concentración media de la curva patrón (0.270 ug/ml). En el caso de la suspensión proceder de la siguiente forma:

Pipetar exactamente 1.0 ml del jarabe en un matraz aforado estéril de 200 ml., disolver con 10 ml de dimetil sulfoxido y diluir con tampón de fosfatos de pH 7.0 hasta obtener una concentración de 10 ug de Rifampicina/s.a. por mililitro. Volver a diluir 2.7 ml de esta dilución con tampón de fosfatos de pH 7.0 hasta obtener 10 ml.

Repetiendo cuatro veces la operación, pipetar en tubos de ensayo 1.0 ml de la última dilución, - agregándose a cada uno de ellos 9 ml de caldo inoculado (medio B).

Incubación

Una vez que se hayan preparado las diluciones finales de la prueba y del patrón, homogenícese el contenido de cada tubo de ensayo mediante un agitador vibratorio (vortex), colóquese la gradilla en el baño maría de agitación, calentando previamente a 37°C e incúbese a aproximadamente 120 sacudidas por minuto. Determinése mediante ensayos previos el tiempo de incubación óptimo, que en el caso de Rifampicina es de dos hrs. aproximadamente. Interrúmpase la incubación tan pronto como el contenido de los tubos de ensayo patrón con la menor concentración en sustancia activa, medida a

578 nm en celdas de 1 cm de espesor, muestre una transmitancia de aprox. 50 o 55%, mientras que -- los tubos con mayor concentración de la curva patrón, muestren aprox. 80% de transmisión. Llegado este momento, enfríense todos los tubos de ensayo simultáneamente en un baño maría frío a aproximadamente 20°C y a continuación deténgase el crecimiento de los microorganismos agregando 0.2 ml de solución de formaldehído diluída (al 4 o 5%). Homogenícese el contenido de los tubos de ensayo mediante un agitador vibratorio.

Medición del enturbiamiento

Ajústese el fotómetro a una extinción igual a cero con una mezcla homogenizada constituida por -- 9 ml. de medio de ensayo no inoculado, 1 ml. de solución tampón y 0.2 ml de solución tampón y 0.2 ml de solución de formaldehído diluída en celdas con 1 cm de espesor de 578 nm. Determinéense en celdas iguales y a la misma longitud de onda los valores de extinción del líquido de cultivo incubado procedentes de los tubos de ensayo patrón y de prueba.

Trazado de la Curva Patrón

Calcúlese el valor medio a partir de los valores

de cada punto patrón, regístrense los puntos de medición en un sistema de coordenadas semilogarítmico (la concentración de la sustancia inhibidora a escala logarítmica y los valores de extinción correspondientes a escala aritmética) y fíjese la inclinación de la mejor recta patrón posible, calculando el punto de referencia menor (L) y mayor (H) en la curva patrón, es decir, según las ecuaciones siguientes:

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5} \qquad H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Donde:

L = extinción calculada de la menor concentración

H = extinción calculada de la mayor concentración

a,b,c,d,e= valores medios de extinción de las 5 concentraciones de las rectas patrón (de menor a mayor concentración).

Calcúlese el valor medio de las extinciones medidas de la prueba desconocida y regístrese en el sistema de coordenadas.

Léase la actividad microbiológica de la prueba directamente del diagrama de la curva patrón.

Cálculo de la actividad microbiológica

Rifampicina/s.a. en mg. por ml de jarabe = a.b/1000

a = Valor de actividad en ug/ml tomado del diagrama de la curva patrón.

b = Factor de dilución es el inverso de las diluciones efectuadas a la muestra.

$$\frac{1 \text{ ml de jarabe}}{200 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ ml.}}{100 \text{ ml.}} \times \frac{2.7 \text{ ml.}}{10 \text{ ml.}} \times \frac{1 \text{ ml.}}{10 \text{ ml.}} = 74074$$

Es decir la concentración que se obtiene directamente del diagrama de curva patrón, es la que hay en el tubo final. Es necesario multiplicarla por las diluciones para obtener la concentración real de la suspensión.

5. REGISTRO Y ORGANIZACION DE DATOS

Anotar sus resultados en la siguiente forma y anexar la gráfica con la curva patrón (después de haber anotado en la parte de atrás de la misma los cálculos pertinentes).

REPORTE DE ANALISIS
DE ANTIBIOTICOS

U.N.A.M.

Lab. de Microbiolo-
gía Farmacéutica

Práctica No.:

ANTIBIOTICO: RIFAMPICINA CANTIDAD:

DETERMINACIONES . LIMITES RESULTADOS:

Determinación de la activi-
dad microbiológica de Rifam-
picina.

90 a 110% de la

dosis declarada.

ANALIZO:

FECHA:

OBSERVACIONES:

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

¿De acuerdo a los límites proporcionados en la hoja de reporte de análisis, el producto que usted analizó es tá dentro o fuera de especificaciones? Si está fuera de ellas ¿a qué causa atribuye el error?

¿Cuál es el mecanismo de acción de la Rifampicina? -

¿Cuál es su espectro de acción?

¿Por qué es necesario corregir la curva patrón?

¿Cuál es la finalidad de establecer límites para el período de incubación, de modo que el tubo conteniendo la mayor concentración tenga una transmitancia del 80% y el tubo conteniendo la menor concentración de antibiótico tenga una transmitancia del 50 ó 55%.

- Explique el fenómeno de resistencia bacteriana.
- Defina qué es el espectro de acción de un antibiótico.
- ¿Cuál es la diferencia entre bactericida y bacteriostático?.

PRACTICA # 5

DETERMINACION DE LA POTENCIA DE UN ANTIBIOTICO

DETERMINACION MICROBIOLOGICA DE LA ACTIVIDAD DEL AN-
TIBIOTICO NEOMICINA

METODO DE DIFUSION EN PLACA

1. INTRODUCCION

Los microbiólogos, los microbiólogos del suelo en particular, habían notado desde hacía tiempo que el suelo contenía pocas bacterias capaces de causar enfermedades infecciosas en el - hombre o en los animales. Tan es así que los cuerpos de las personas muertas debido a enfermedades infecciosas han sido enterrados en la tierra a través de todos los tiempos. Era evidente que tales organismos no sobrevivirían mucho tiempo en la tierra. Hombres tales como René Dubos y Selman Wask--man encontraron una explicación para ello al descubrir microbios provenientes del suelo que resultaron ser antagonistas de microorganismos patógenos por lo que resultaba ser éso lo que les acarrecaba su rápida destrucción dentro del suelo.

El estudio de las bacterias del suelo fue el interés de toda la vida de Waskman, quien empezó su carrera como microbiólogo agrícola. Nacido en Ucrania en 1888, emigró a América en 1910. Su primera investigación estuvo basada en el efecto -

de los hongos y las bacterias en la fertilidad del suelo. Fue durante este periodo en que el examen microscópico del suelo le condujo a la identificación de un grupo de microorganismos que no eran propiamente ni bacterias ni hongos, sino algo similar a ambos. Waskman identificó a este grupo de microorganismos como "Actinomicetos" y aisló y estudió un buen número de ellos, incluyendo en 1915, el *Streptomyces griseus*, que posteriormente en 1943 daría origen a la estreptomycin. Cuando escribió su autobiografía, Waskman hizo mención que en 1915 ellos no efectuaron pruebas para medir sus propiedades antibacterianas. "En ese tiempo", escribió, "no estábamos interesados en los antibióticos". Sin embargo, en 1939 un alumno de Waskman, Dubos, aisló el antibiótico tirotricina de *Bacillus brevis* encontrado en una muestra de suelo de New Jersey. Aunque este antibiótico era tóxico para el hombre, el interés médico se centró en la actividad antibacteriana de los microorganismos del suelo. Waskman tenía la firme creencia, basada en su experiencia, de que los hongos y los actinomicetos podían proveer agentes antibacterianos más efectivos y menos tóxicos que los hasta entonces conocidos.

En 1939 Merck and Company proveyeron a Waskman con asistencia química, equipo y animales para experimentación con lo que continuó su investigación sobre los antibióticos del suelo en la Universidad Rutgers en Nueva Jersey. Regresando a

su teoría original acerca del valor potencial de los actinomicetos, Waskman aisló en 1940 la Actinomicina A. Esta sustancia probó ser demasiado tóxica para uso antimicrobiano en general, pero subsecuentemente un antibiótico relacionado, Actinomicina D, ha sido de gran valor en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkins.

Los Estados Unidos entraron a la Segunda Guerra Mundial en 1941 y la necesidad de agentes antimicrobianos potentes se convirtió en un incentivo muy fuerte en la investigación de Waskman. La penicilina estaba demostrando tener un valor -- sin precedentes contra las infecciones Gram positivas e inspiraba la búsqueda de un antibiótico que pudiera destruir a los microorganismos Gram negativos insensibles a la penicilina. Waskman y sus asociados emprendieron un programa intensivo. Aislaron alrededor de 10,000 cultivos frescos de diferentes microorganismos. Estos fueron probados para medir su actividad en contra de las bacterias. El diez por ciento de ello demostraron poseer dicha potencialidad de los cuales -- cien de ellos eran cultivos prometedores hasta que finalmente triunfaron en el desarrollo de procedimientos para el aislamiento de diez. Estos diez compuestos fueron probados para analizar su actividad terapéutica en animales y sólo uno de ellos demostró ser exitoso como agente antimicrobiano, Estreptomicina. La Estreptomicina fue aislada de *Streptomyces griseus* en 1943, 28 años después de que Waskman descubriera por primera vez el microorganismo.

La estreptomycinina pertenece a un gran grupo de antibióticos relacionados conocidos como el grupo de aminoglicósidos. Químicamente, cada miembro importante de este grupo contiene -- dos aminoazúcares, cada uno unido a través de enlaces glicosídicos a una molécula de aminociclitol. Los aminoglicósidos son pobremente absorbidos por vía oral, de modo que necesitan ser administrados por vía parenteral para alcanzar -- efectos antimicrobianos a nivel sistémico. No penetran el -- fluido cerebroespinal y son rápidamente excretados por vía -- renal. En adición a las usuales reacciones de hipersensibilidad producidas por los antibióticos (urticaria, picazón, eosinofilia) la terapia usando los aminoglicósidos puede resultar en tres tipos de reacciones tóxicas serias: Ototoxicidad, nefrotoxicidad y en forma más rara una reacción tipo -- "Curare" que causa un bloqueo neuromuscular con dificultad -- respiratoria.

Aunque se encontró que la estreptomycinina era efectiva contra un buen número de bacterias patógenas gram negativas y gram positivas, la cualidad sobresaliente de este antibiótico era el hecho de que podía curar la tuberculosis. La estreptomycinina es usada todavía en el tratamiento de esta enfermedad, aunque ahora usualmente se encuentra en combinación con isoniazida y otros agentes tuberculostáticos descubiertos recientemente.

Continuando su investigación sobre los actinomicetos, el gru

po de la Universidad de Rutgers dirigido por Waskman, aisló - un nuevo antibiótico a partir de Streptomyces fradiae en - - 1949. En su forma cruda, esta sustancia consiste de un agente antimicótico (Fradicina) y un grupo de tres antibióticos relacionados estrechamente que cuando se purifican son llamados Neomicina A, B y C. La neomicina producida hoy en día - está compuesta principalmente de Neomicina B. La neomicina tiene una actividad antibacteriana de amplio espectro, generalmente similar al de la estreptomicina. Aunque inicialmente se pensó que podía ser importante en el tratamiento de la tuberculosis debido a su alta actividad contra el bacilo de la tuberculosis, desgraciadamente estudios clínicos posteriores pronto revelaron que la neomicina causaba la pérdida permanente del oído en mayor grado que la estreptomicina.

Aunque en ese momento la neomicina se ganó el título de droga tóxica, posteriormente se le encontraron muchos usos seguros, especialmente los usos tópicos, sin embargo la aplicación tópica en heridas o en irrigación de la vejiga puede -- también causar toxicidad si la dosis es alta o si la terapia es prolongada, particularmente en pacientes anúricos.

Durante las décadas que siguieron al descubrimiento de la estreptomicina los investigadores de todo el mundo dedicaron - sus talentos al descubrimiento de nuevos antibióticos. En - 1957 científicos japoneses aislaron el antibiótico Kanamicina (Kanamicina A) a partir de una variedad de Streptomyces -

kanamycetius. Este agente es un antibiótico de amplio espectro y es usado a menudo en el tratamiento de infecciones debidas a gérmenes de Gram negativos, particularmente Klebsiella, Enterobacter, Proteus y E. coli y también es activa contra S. aureus. Seis años después de que la Kanamicina -- fuera descubierta en Japón, investigadores en los Estados -- Unidos de los Laboratorios de Investigación Schering, descubrieron la gentamicina, ahora considerada junto con la tobramicina y amikacina como uno de los más importantes aminoglicósidos. La gentamicina tiene la actividad antibacteriana -- más grande que cualquiera de los anteriores aminoglicósidos, prácticamente todas las enterobacterias son sensibles a ella. En particular se estima que el 95% de las variedades de Pseudomonas encontradas clínicamente, son inhibidas por 10 mcg/-ml de gentamicina. Dado que la carbenicilina y la gentamicina muestran efectos antibacterianos sinérgicos, se sugiere su uso en las infecciones severas de Pseudomonas. Los peligros de la ototoxicidad y nefrotoxicidad asociados con la gentamicina, al igual que con todos los aminoglicósidos, indican que su uso debe ser restringido al tratamiento de infecciones seriás, particularmente a aquellas causadas por Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter, Klebsiella y Serratia, ante las -- cuales otros agentes menos tóxicos son inefectivos. Los aminoglicósidos descubiertos más recientemente son la tobramicina, sisomicina y amikacina.

La tobramicina al igual que otros aminoglicósidos ha demostrado

do eficacia clínica en el tratamiento de pacientes que sufren infecciones severas producidas por microorganismos gram negativos. La tobramicina exhibe la actividad antibacteriana más potente "in vitro" contra *Pseudomonas aeruginosa*. La tobramicina fue descubierta en 1971. En 1973 fue reportado el descubrimiento de un nuevo antibiótico del grupo de los aminoglicósidos el cual fue llamado sisomicina. La sisomicina fue aislada a partir de *Micromonospora inyoensis*, es también similar a la gentamicina con mayor actividad contra un cierto número de especies Gram-negativos.

La amikacina es un nuevo aminoglicósido semisintético derivado de la kanamicina A. Su uso está limitado a infecciones serias causada por organismos susceptibles gram-positivos y gram-negativos, incluyendo *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, -- *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*. La Amikacina no es desactivada por la mayoría de las enzimas comunes desactivadoras de aminoglicósidos y por esta razón puede ser efectiva contra variedades de *Proteus*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* que son resistentes a la gentamicina, Kanamicina y/o Tobramicina. Algunos investigadores sienten que su uso debe ser limitado para el tratamiento de las infecciones causadas por tales organismos resistentes.

La manera exacta en la cual los aminoglicósidos destruyen -- las bacterias ha sido tema de estudio pero aún permanece sin haber sido completamente explicada. Sin embargo, se ha des-

cubierto que los aminoglicósidos no actúan en la manera en que lo hace la penicilina. Mientras que la penicilina interfiere con la síntesis de la pared celular, los aminoglicósidos se enlazan irreversiblemente a las subunidades ribosomales 30 S, inhibiendo con ello la biosíntesis de proteínas y por tanto conduciendo a la célula a la muerte.

Después de haber hablado un poco sobre el grupo de antibióticos al cual pertenece la neomicina, hablaremos ahora acerca del método para la determinación de su actividad microbiológica.

El método de cilindros en placa, está basado en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical a través de una capa de agar solidificado en una caja petri y al cual se le ha inoculado un cierto microorganismo, el crecimiento de dicho organismo es inhibido en un área circular alrededor del cilindro y se le llama zona de inhibición. Midiendo el diámetro de las zonas de inhibición y comparándolas contra un estándar de actividad conocida, es posible calcular la concentración de la sustancia problema, ya que las zonas de inhibición están relacionadas proporcionalmente a la concentración de antibiótico presente.

2. OBJETIVOS

Establecer el segundo método para la determinación de la potencia de un antibiótico.

El alumno será capaz de:

- Determinar la potencia de un antibiótico por el método de cilindros en placa.

3. HIPOTESIS

Al termino de la incubación, como el tamaño de los halos de inhilución formadas es proporcional a la concentración del antibiótico; los cilindros con mayor concentración de antibiótico presentan zonas de inhilución con mayor diámetro que aquellos con menor concentración.

Si el producto analizado realmente tiene la potencia descrita en la etiqueta mostrará halos de inhilución semejantes a los de la concentración media de la curva patrón.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

4.1 Materiales:

Fotómetro

Celdas para fotómetro de 1 cm de espesor

Baño maría

Aparato para leer zonas de inhibición (FISCHER- -
LILLY, FISCHER SCIENTIFIC CO., E.U. o equivalen-
te) con exactitud de lectura de 0.1 mm.

Cajas petri con fondo plano, 100 mm de diámetro,
22 mm de altura con tapa de material adecuado.

Cilindros de acero inoxidable o porcelana, 8 mm \pm
0.1 mm de diámetro exterior, 6 mm \pm 0.1 mm de diá-
metro interior, 10 mm \pm 0.1 mm de longitud (los -
cilindros se deberán limpiar cuidadosamente para
remover todos los residuos, se recomienda sumer-
girlos en un baño ácido de vez en cuando, p. ej.
con ácido nítrico 2 N o con ácido crómico).

Tubos de ensayo

Frascos de Roux

Matraces aforados, pipetas

4.2 Reactivos:

Medios de cultivo y tampón:

Preparar los medios de cultivo siguientes a par-

tir de medios de cultivo desecados y estandarizados. Estos se pueden obtener también como medios desecados y listos para su uso, p. ej. en la firma BBL (Baltimore Biological Laboratory, E.U.) o en la firma DIFCO (DIFCO Laboratories, Detroit, - Michigan, E.U.).

Medio A (Antibiótico medio 1)

Peptona	6.0 gr.
Caseína digerida pancreáticamente	4.0 gr.
Extracto de levadura	3.0 gr.
Extracto de carne	1.5 gr.
Glucosa	1.0 gr.
Agar	15.0 gr.
Agua destilada c.s.p.	1000.0 ml.
pH tras esterilización	6.6 ± 0.1
Esterilización	20 minutos a 120°C

Medio B (Antibióticos medio 11)

Igual que el medio A excepto que el pH final después de esterilización es de 8.3 ± 0.1

Tampón de fosfato (Buffer # 3)

K HPO	16.730 gr.
KH PO	0.523 gr.
Agua destilada c.s.p.	1000.00 ml.

pH tras esterilización 8.0 ± 0.1
Esterilización 20 mins. a 120°C
Ajustar el pH con NaOH 1 N o con HCl de forma que
después de la esterilización corresponda al espe-
cificado.

Cepa Testigo

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

Incubar la cepa testigo sobre un tubo oblicuo de
agar conteniendo el medio A e incubar a 32°C du-
rante 24 hrs.

4.3 Técnica:

Estandarización de la suspensión a inocular

Poner en suspensión el cultivo de un tubo de agar
inclinado que contiene el medio A con unos 3 ml.
de solución fisiológica estéril e inocular con --
ello un frasco de Roux que contenga 300 ml de me-
dio A, distribuyendo uniformemente la suspensión
con perlas de vidrio estériles sobre toda la super-
ficie. Después de incubar a $32 - 35^{\circ}\text{C}$ durante 24
hrs., los gérmenes se arrastran con 50 ml. de so-
lución salina fisiológica estéril y seguidamente
se conservan en refrigeración (es estable una se-
mana aproximadamente).

Esta suspensión a inocular se estandariza con solución salina fisiológica estéril en el espectrofotómetro a 546 nm en celdas de 1 cm de espesor, hasta el 25% de transtancia, con respecto al valor del blanco (igual a 100% de transmitancia) empleando una solución fisiológica estéril de cloruro sódico como blanco. El medio B se inocula con 0.1% de esta suspensión.

Placas de Prueba

A modo de capa básica, se pasan con pipeta primero a cada caja petri, 15 ml. del medio B sin inocular, a una temperatura de 60 a 70°C y se dejan solidificar.

El resto del Medio B se enfría hasta una temperatura de 48°C, se inocula con el microorganismo -- problema y se homogeniza, 6 ml. de ello se pasan a la capa básica solidificada y se distribuyen uniformemente. Una vez se haya solidificado la segunda capa, sobre cada caja petri se colocan seis cilindros estériles.

Soluciones patrón:

Se emplea un estándar de referencia USP con neomicina base de actividad conocida. Este estándar -

se deseca previamente al vacío de 5 Torr durante 3 hr. a 60°C. Con ello se prepara en un matraz - graduado estéril, en tampón de fosfato pH 7.9, -- una solución cuya concentración inicial sea de 1 mg/ml. A partir de esta solución, se prepara -- otra cuya concentración sea de 10 ug de neomicina base por ml. Con esta última solución se prepara la curva patrón de la manera siguiente:

<u>Solución de 10ug/ml</u>	<u>Tampón</u>	<u>Concentración Final</u>
<u>ml</u>	<u>ml</u>	<u>ml</u>
0.64	c.s.p. 10	0.64
0.80	c.s.p. 10	0.80
1.00	c.s.p. 10	1.00
1.25	c.s.p. 10	1.25
1.56	c.s.p. 10	1.56

Solución Problema:

Diluir un volumen medido exacto de la solución -- del producto comercial Decadrón (solución de sulfato de neomicina y fosfato sódico de dexametasona, solución oftálmica) o bien algún otro producto equivalente que contenga Neomicina, con tampón de fosfato pH 7.9 hasta obtener una "dilución de prueba" teniendo una concentración igual a la media de la curva patrón (1 ug/ml).

A no ser que se indique otra cosa, la solución oftálmica de sulfato de neomicina y fosfato sódico de dexametasona comercial, contiene 3.5 mg. de neomicina por ml y 1.0 mg de fosfato de dexametasona por ml.

Ejecución de la prueba de difusión:

Para los puntos de referencia 1, 2, 4 y 5 de la curva patrón, equivalentes a las concentraciones de 0.64 ug/ml, 0.80 ug/ml, 1.25 g/ml y 1.56 ug/ml, se precisan para cada uno tres placas de ensayo con seis cilindros cada una, es decir tres placas para cada concentración, o sea, que en total son 12 placas con seis cilindros respectivamente. De cada placa recúbranse tres cilindros con la concentración de un punto base y tres con la concentración de referencia (concentración media de la curva patrón) haciéndolo de forma alternada. De esta manera se obtienen por cada punto base 9 valores y 36 valores para la concentración media de la curva patrón.

Las placas se incuban a 32-35°C durante 24 horas.

Para la solución problema se emplean tres placas de ensayo, de cada placa se recubren tres cilindros con la solución problema diluída a la concen

tracción de referencia (1 ug/ml) y tres cilindros con el punto medio de la curva patrón; haciéndolo de forma alternada, por consiguiente se obtiene nueve valores para la sustancia problema y nueve valores para la media de la curva patrón. Las -- placas se incuban a 32-35°C durante 24 horas.

Medición de las zonas de inhibición:

Retírense los cilindros de ensayo, después de la incubación y médanse los diámetros de las zonas de inhibición en el aparato para la lectura de -- las zonas de inhibición.

Evaluación:

Calcúlese:

- el valor promedio de cada uno de los puntos de referencia (1, 2, 4 y 5) de la solución patrón y los llamaremos a, b, c y d.
- los valores promedio de los nueve puntos de patrón que tienen la concentración media, pertenecientes a cada punto (c_1 , c_2 , c_3 , c_4 y c_5).
- el punto de referencia de la curva patrón -- (c = promedio de los 36 valores que contenían la concentración media de la curva patrón.

A continuación se corrige cada uno de los cuatro puntos base. El factor de corrección para el primer punto base es igual a $c - c_1$. Si este valor es positivo sùmese a a y si es negativo sustráigase de a . De modo análogo se corrigen el 2, 4 y 5 -- puntos base de la curva patrón.

Los puntos base corregidos y el punto de referencia de la curva patrón se anotan en un sistema de coordenadas semilogarítmico (concentración de la sustancia inhibidora en escala logarítmica, diámetro de las zonas correspondientes en escala aritmética) y la serie de puntos que se obtiene así se une con la recta patrón mejor posible.

La linealidad de las rectas de regresión está asegurada en el sector de concentración señalado y -- bajo las condiciones experimentales definidas. La inclinación de la recta patrón mejor posible puede fijarse, calculando el punto de referencia más bajo (L) y el más alto (H) en la curva patrón, según las ecuaciones siguientes:

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5} \quad H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

L = punto base más bajo calculado en la recta patrón.

H = punto base más alto calculado en la recta patrón

a, b, d, e = diámetro corregidos de las zonas de inhibición en promedio de los cuatro puntos base

c = diámetro promedio de las zonas de inhibición de la concentración media de la curva patrón (de 36 valores respectivamente).

Siempre que el diámetro promedio de las zonas de inhibición de la concentración media de la curva patrón en las tres placas de prueba que contienen la solución problema (9 valores) no coincida con el punto de referencia de la curva patrón (promedio de los 36 valores) se corregirá convenientemente el valor promedio de los diámetros de las zonas inhibitorias de la solución problema. Si el valor del patrón a la concentración media de la curva en promedio para las tres placas con problemas es mayor que el valor promedio del punto de referencia (promedio de los 36 valores) la diferencia se sustrae del diámetro promedio de las zonas inhibidoras de la solución problema, si es mayor se suma.

El diámetro promedio de las zonas inhibidoras de la solución problema así corregido se anota en el

sistema de coordenadas.

La actividad de la solución problema se lee directamente en la curva patrón, el contenido en mg de base activa de neomicina por ml. de la solución - del producto se calcula del modo siguiente:

$$\text{mg de neomicina base por ml de solución} = \frac{a \cdot b}{1000}$$

a = valor de la actividad en ug/ml de neomicina - base en la solución problema tomado del diagrama de la curva patrón.

b = factor de dilución (3500)

5. REGISTRO Y ORGANIZACION DE DATOS:

Anotar sus resultados en la siguiente forma y anexar la gráfica con la curva patrón (después de haber anotado en la parte de atrás de la misma los cálculos pertinentes).

REPORTE DE ANALISIS DE ANTIBIOTICOS

UNAM

Lab. de Microbiología Farmacéutica

Práctica No.:

ANTIBIOTICO: NEOMICINA (BASE)

CANTIDAD:

DETERMINACIONES:

LIMITES:

RESULTADOS:

Determinación de la actividad microbiológica de Neomicina (Base)

90-110% de la dosis aclarara.

ANALIZO:

FECHA:

OBSERVACIONES:

6. ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

De acuerdo a los límites proporcionados en la hoja de reporte de análisis, el producto que usted analizó ¿Está dentro o fuera de especificaciones? Si está fuera de ellas ¿a qué causas atribuye el error?

- Sugiera otra forma de corregir la curva patrón que no sea la indicada en esta técnica.

¿Por qué se usa para cada antibiótico particular una cepa especial ATCC? ¿Qué significa ATCC?

¿Por qué las placas de petri usadas para la prueba son preparadas con una base de 15 ml sin inocular y sólo 6 ml. para la capa inoculada con el microorganismo?

7. BIBLIOGRAFIA

- Antibiotics: in historical perspective. Merck Sharp & Dohme International. 1981
- Code of Federal Regulations 21, Parts 141 to 169, -- paragraph 141.110 Revised as of April 1st, 1973; U.S. Govern Printing Office, Washington D.C.
- Cosgrove, R.F.; Novel Approach to Analysis of Antibiotics. Anal Proc. 21:8, 295-297, 1984
- Parascandola, J.; Dawn of the antibiotic era. Pharm. Tech. 4:60, p. 65-66 Nov 1980
- Simpson, D.L.; Kobos, R.K.; Microbiological assay of antibiotics based on inhibition of ammonia production monitored with an ammonia electrode; Anal. Chim. Acta 164: 273-277, 1984
- Simpson, D.L., Kobos, R.K.; Potentiometric microbiological assay of gentamicin, Streptomycin and Neomycin with a Carbon Dioxide gas-sensing electrode. Anal. -- Chem. 55:12 p. 1974-1977 1983
- United States Pharmacopeia USP XXI
- Vanderwielen, Adrianus J.; Guidelines for assay validation, Pharmaceutical Technology, March 1982 pages - 66-67

PRACTICA # 6PRUEBA DE ESTERILIDAD EN INYECTABLESMETODO DE FILTRACION EN MEMBRANA1. INTRODUCCION

La prueba de esterilidad es usada en la industria farmacéutica para determinar si un artículo cumple los requerimientos para ser estéril. A continuación daremos una descripción general de los conceptos y principios involucrados en el control de calidad de artículos que deben ser estériles.

Dentro de la más estricta definición de esterilidad, un espécimen debería ser considerado estéril sólo cuando hubiera la ausencia por completo de organismos viables en él. Sin embargo, esta definición absoluta no puede ser aplicada en la práctica a un lote entero de producto terminado debido a las limitaciones de la prueba. La esterilidad de un lote etiquetado como estéril está entonces definida en términos de probabilidad donde la posibilidad de tener una unidad contaminada del artículo es aceptablemente remota. El aseguramiento de la esterilidad puede ser establecido sólo a través del uso de ciclos de esterilización adecuados y subsecuente proceso aséptico, si se requiere, bajo las apropiadas prácticas de buena manufactura y no por confianza únicamente en la prueba de esterilidad. Los principios básicos para la vali-

dación y certificación de un proceso de esterilización están enumeradas como sigue:

- 1) Establecer que el equipo de proceso tiene la capacidad de operar dentro de los parámetros requeridos.
- 2) Demostrar que los controles críticos del equipo y la -- instrumentación son capaces de operar dentro de los parámetros descritos para el equipo de proceso.
- 3) Llevar a cabo repetición de ciclos representando el ran go operacional del equipo empleando producto actual o - simulado. Demostrar que los procesos han sido llevados a cabo dentro de los límites prescritos en el protocolo y verificar finalmente que la probabilidad de supervi-- vencia de microorganismos en los procesos replicados no es mayor que la establecida en los límites.
- 4) Monitorear el proceso validado durante la operación de rutina. Periódicamente como se necesite, recalificar - y rectificar el equipo.
- 5) Completar los protocolos y documentar los pasos del 1 - al 4 indicados anteriormente.

Los principios e implementación de un programa para validar un proceso aséptico son similares a la validación de un proceso de esterilización. En un proceso aséptico los componen tes de la forma farmacéutica final son esterilizados separa-

damente y el artículo terminado es ensamblado en una forma -
aséptica.

La validación de un proceso de esterilización o de un proceso aséptico requiere un alto nivel de conocimiento en el campo de la esterilización y tecnología de áreas limpias. De manera de cumplir con los actuales límites (alcanzables y -- aceptables) en parámetros de esterilización, es necesario emplear la apropiada instrumentación y equipo para controlar - los parámetros críticos tales como, temperatura y tiempo, humedad y concentración de gas esterilizante o radiación absorbida.

Un aspecto importante del programa de validación en muchos - procesos de esterilización involucra el empleo de indicadores biológicos. La validez y certificación del proceso deben ser revalidados periódicamente, sin embargo, el programa de revalidación no necesita ser necesariamente tan extensivo como el programa original.

Es de la aceptación general que los artículos inyectables esterilizados terminalmente o los equipos que se venden como - estériles, cuando son procesados en la autoclave alcancen -- una probabilidad de microorganismos sobrevivientes de 10^{-6} ; p.ej. se asegura que hay menos de una posibilidad de un millón de que microorganismos viables estén presentes en el artículo esterilizado o forma farmacéutica. En el caso de ar-

tículos estables al calor, el objetivo es, a menudo, exceder considerablemente el tiempo crítico necesario para alcanzar la probabilidad de 10^{-6} de microorganismos sobrevivientes -- (overkill). Sin embargo con un artículo donde una extensa exposición al calor puede tener un efecto dañino, puede no ser adecuado el empleo de este enfoque de sobreexceso. En este último caso, el desarrollo del ciclo de esterilización depende fundamentalmente en el conocimiento de la carga microbiana del producto basada en el examen de la misma, a través de un adecuado periodo de tiempo, de un número sustancial de lotes de producto antes de ser esterilizado.

El valor D es el tiempo en minutos requerido para reducir la población microbiana en un 90% o en un logaritmo (p. ej. - fracción sobreviviente de 1/10) a una temperatura específica. Supongamos que el valor D de un preparado de un indicador biológico de por ejemplo *Bacillus stearothermophilus* es de 1.5 para el proceso total a 121°C, si este preparado fuera tratado 12 minutos bajo las mismas condiciones, se puede establecer que la letalidad aplicada fue de 8 D. El efecto de aplicar esto al producto dependería de la carga microbiana inicial. Asumiendo que la resistencia a la esterilización de nueva biocarga es equivalente a la del indicador biológico, si la biocarga del producto en cuestión es de 10^2 microorganismos, una letalidad aplicada de 2D reduciría la carga microbiana a 1 (10^0) y una letalidad adicional aplicada -

de 6D daría una probabilidad calculada de 10^{-6} microorganismos sobrevivientes (bajo las mismas condiciones, una letalidad aplicada de 12D podría ser usada para un enfoque típico de sobredosis). Generalmente la probabilidad de sobrevivientes alcanzada por el artículo bajo el ciclo de esterilización validado no está completamente correlacionado con lo que puede ocurrir con el indicador biológico, por lo que para fines de validez, es esencial que la resistencia del indicador biológico sea mayor que la de la carga microbiana natural del artículo esterilizado. Es entonces apropiado hacer una conjetura sobre el caso extremo y tratar la carga microbiana como si su resistencia al calor fuera equivalente a la del indicador biológico.

En el ejemplo anterior, un ciclo de 12 minutos es considerado adecuado para la esterilización si el producto tuviera una carga microbiana de 10^2 microorganismos, sin embargo, si la carga del producto fuera originalmente de 10^6 , entonces con ese mismo ciclo tendríamos una probabilidad de encontrar sobrevivientes de 10^{-2} . Este tipo de situaciones debe ser evitado mediante el monitoreo continuo de la biocarga porque compromete seriamente la esterilidad del producto.

Existen cinco métodos principales de esterilización terminal, aunque desde luego los modernos desarrollos tecnológicos han conducido al descubrimiento de procesos adicionales (por ejemplo el moldeo por soplado, etc.)

La elección del proceso apropiado para una forma farmacéutica dada requiere de un alto nivel de conocimientos de las técnicas de esterilización y de la información concerniente a todos los efectos del proceso sobre el material a ser esterilizado.

Los cinco métodos son:

- Esterilización por vapor (autoclave, $t = 121^{\circ}\text{C}$)
- Esterilización con calor seco (Horno, $t = 250^{\circ}\text{C}$, despirogenizar)
- Esterilización con gas (óxido de etileno)
- Esterilización por radiación ionizante (gama y haz de electrones)
- Esterilización por filtración (filtros de $0.22\ \mu\text{m}$)

Aunque es del conocimiento general que la esterilización final del contenedor lleno de una forma farmacéutica o de equipo ya empacado es el proceso preferido para asegurar el mínimo riesgo posible de contaminación en un lote, hay una clase sustancial de productos que no son esterilizados terminalmente sino que son preparados a través de una serie de pasos asépticos.

Un producto definido como asépticamente procesado es aquel en el cual los componentes han sido esterilizados por uno de los procesos descritos anteriormente y después ensamblado en forma aséptica. Por ejemplo, el producto a granel puede ser

esterilizado por filtración, los contenedores vacíos pueden ser esterilizados por calor seco, etc.; los requerimientos - para un proceso aséptico están principalmente dirigidos a:

- a) un aire ambiental libre de microorganismos viables
- b) Personal operativo debidamente entrenado y equipado
- c) flujo laminar, presión positiva y acabados sanitarios en el área
- d) monitoreo continuo del área

Como se dijo al principio, debe reconocerse que la prueba de esterilidad no puede detectar contaminación microbiana si só lo está presente en un pequeño porcentaje de los artículos - terminados del lote porque el número especificado de unida-- des a ser muestreadas imponen una limitación estadística sig nificante sobre la utilidad de los resultados de la prueba. Eso sin contar con los problemas que presenta la prueba en - sí, ya que existe la posibilidad de que los resultados posi- tivos en la prueba, puedan ser debidos a fallas en las técnⁱcas asépticas empleadas o contaminación ambiental durante el análisis.

Por lo anteriormente expuesto, el principal medio para afir- mar que un lote de producto o de artículos terminados son eg t^eriles, consiste en la documentación de la producción y el r^ecord de esterilización del lote y los records adicionales de validación que garantizan que el proceso de esteriliza- -

ción posee la capacidad de inactivar totalmente la establecida carga microbiana del producto o bien de un reto más resistente; más aún, debe ser demostrado que todos los pasos del proceso que involucran al producto expuesto antes de la esterilización son llevados a cabo de manera aséptica para prevenir contaminación.

Si los datos derivados del proceso de manufactura, de la validación y estudios del proceso de esterilización y de los controles en proceso son analizados y proveen mayor aseguramiento de que el lote cumple, la requerida baja probabilidad de contener una unidad contaminada (comparada a los resultados de la prueba de esterilidad de unidades terminadas tomadas de ese lote), entonces los procedimientos para efectuar la prueba de esterilidad pueden ser mínimos o incluso pueden eliminarse como análisis de rutina. Sin embargo, asumiendo que todos los criterios de producción arriba citados se han cumplido, puede todavía ser deseable llevar a cabo la prueba de esterilidad en muestras reducidas del lote de artículos terminados.

Existen dos procedimientos para la prueba de esterilidad:

- 1) transferencia directa al medio de prueba y
- 2) técnicas de filtración por membrana

La elección del método se hará de acuerdo a las características del producto a examinar, el método de filtración por mem

brana es útil al examinar muestras filtrables procedentes de recipientes relativamente grandes, así como de productos filtrables con actividad bacteriostática o fungistática. Para el examen de productos no filtrables tales como aceites, ungüentos o cremas, se usará el método de inoculación directa, en ambos casos, según se requiera pueden usarse soluciones antibacteriostática y antifungistática.

Debido a la diversidad en la naturaleza de los artículos a ser probados el tamaño de la muestra depende del tamaño del lote, del tamaño de unidad y del tipo de proceso utilizado (aséptico o esterilización terminal).

La muestra a ser probada se filtra usando el aparato de filtración adecuado y las membranas se siembran respectivamente en dos medios de cultivo: medio fluido de tioglicolato para comprobar bacterias, obligada a facultativamente anaerobias y medio de peptona de caseína y de soya para comprobar la presencia de bacterias y hongos aerobios y se incuban durante 10 a 14 días.

Para confirmar la esterilidad de cada lote de medio, se incuban contenedores representativos a la temperatura y durante el tiempo especificado para la prueba.

Para probar las cualidades para promoción de crecimiento de cada carga de autoclaveado de cada lote de medio, separadamente se inoculan los medios (cada uno) con organismos de -

prueba en suspensión (siembra de máximo 100 microorganismos) y se incuban de acuerdo a las condiciones especificadas.

Si después del período de incubación los tubos inoculados -- con el producto no presentan crecimiento, el artículo cumple con los requerimientos de la prueba de esterilidad. Si se encontrara crecimiento, se hará una investigación para determinar si el análisis fué válido o no. Si no se encuentra -- evidencia que invalide el primer análisis se repite la prueba con el doble de muestras. Si no se observa crecimiento -- en esta etapa, el artículo cumple con los requerimientos de la prueba de esterilidad, si se observa crecimiento, el resultado así obtenido es concluyente de que el artículo no -- cumple los requerimientos de la prueba de esterilidad.

2. OBJETIVOS

Establecer los métodos utilizados en la industria farmacéutica para probar la esterilidad de los productos parenterales de pequeño y gran volumen, y equipos de venoclisis.

Esta práctica describe el procedimiento para la prueba de esterilidad por el método de filtración por membrana.

El alumno será capaz de:

- efectuar la prueba de esterilidad por el método de filtración sobre membrana en un inyectable de pequeño volumen y en uno de gran volumen.

- recordar los fundamentos de flujo laminar
- manejar técnicas asépticas adecuadamente.

3. HIPOTESIS

Dado que esterilidad significa ausencia total de microorganismos viables, entonces, si los productos analizados son es tériles no se observará crecimiento en ninguno de los tubos con medio de cultivo. En el caso contrario, si los productos no son estériles habrá crecimiento en uno o ambos de los medios de cultivo.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Materiales:

Aparato de filtración adecuado (p.ej. Sartorius o Millipore)
 Filtros de 0.45 um. de porosidad
 Sujetafiltros
 Pinzas para filtro estériles
 Bomba de vacío
 Campana de flujo laminar
 Incubadores

4.2. Reactivos:

Los medios para la prueba pueden ser preparados como se describe o a partir de mezclas comerciales desecadas, siempre y cuando al reconstituir de acuerdo a las instrucciones del fabricante, tengan las mismas propiedades de promoción del crecimiento que las fórmulas aquí enunciadas.

Medio fluido de tioglicolato

L-Cistina	0.5 gr.
Cloruro de sodio	2.5 gr.
Dextrosa	5.5 gr.
Agar	0.75 gr.
Extracto de levadura	5.0 gr.
Caseína digerida pancreáticamente	15.0 gr.
Tioglicolato de sodio	0.5 gr.
Solución de Resazurina de sodio	1.0 gr.
Agua	1000.0 ml.
Esterilizar en autoclave durante	
15 a 20 mins. a 120°C	
pH tras la esterilización	7.1 ± 0.2

Colocar el medio en recipientes adecuados de tal modo que la mitad de la profundidad del medio no haya cambiado a color rosa al finalizar la incubación. Si más del tercio superior ha adquirido un color rosa (indicador de que ha absorbido -- oxígeno) el medio puede regenerarse por una sola vez, calentando el baño de vapor hasta que el color desaparezca. Cuando el medio está listo para su uso, no más de un décimo de la profundidad del medio debe tener color rosa.

Medio fluido de peptona de caseína y peptona de soya

Caseína digerida pancreáticamente	17.0 gr.
Soya digerida con papaína	3.0 gr.

Cloruro de sodio	5.0 gr.
Fosfato de sodio dibásico	2.5 gr.
Dextrosa	2.5 gr.
Agua	1000.0 ml.
Esterilizar en autoclave durante 15 a 20 mins. a 120°C	
pH tras la esterilización	7.3 ± 0.2

Solución tamponada de cloruro de sodio con adición de peptona

KH_2PO_4	3.56 gr.
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7.23 gr.
NaCl	4.3 gr.
Peptona	1.0 gr.
Agua destilada o desmineralizada	1000.0 ml.

Se envasará en recipientes apropiados.

Tratamiento en autoclave a 120°C durante 20 minutos: pH = 7.

Empleo: para disolver sustancias sólidas hidrosolubles y lavar sustancias con actividad antimicrobiana procedentes de filtros de membrana (Agentes de conservación, antibióticos, quimioterápicos).

4.3 Técnica

Preparación de la muestra

Como muestra elegir 20 ampollitas del mismo lote de una marca comercial, de preferencia buscar ---

unas cuyo principio activo no tenga propiedades antibacterianas, bacteriostáticas o fungistáticas, pues en tal caso, será menester el uso del inactivador respectivo. Se agregará al medio, -- por ejemplo: para sulfamidas: ácido p-amino-benzóico (1% en solución tampón de NaCl con adición de Peptona), para penicilina: penicilasa; para cefalosporinas, B-lactamasa. Se usará como muestra también un parenteral de gran volumen. Se puede elegir frasco o botella con solución salina, dextrosa u otra solución (se necesitan por lo menos 10 recipientes de un lote).

Ampolletas:

En las ampolletas se traza una ranura con un instrumento adecuado y antes de abrirlas se desinfectará la superficie exterior, por ejemplo con alcohol al 70% o con hipoclorito de sodio al 10%.

Una vez abiertas, el contenido se aspira con una pipeta o jeringa estériles y se traslada al aparato filtrador, Dependiendo de la naturaleza del material puede intentarse también vaciar la ampolleta directamente al aparato de filtración en vez de usar la jeringa.

Botellas de Vidrio:

Remueva la tapa externa y la retapa metálica. Flamee el tapón o disco de latex. El tapón puede ser desinfectado con alcohol al 70% y secado al aire antes de flamear.

Use un filtro de aire con aguja para romper el vacío. Deje el filtro en su lugar.

Inserte un equipo de transferencia estéril en el orificio de salida del tapón.

Bolsa de Plástico:

Remueva la sobreenvoltura y el protector e inserte el equipo de administración.

Instrucciones generales:**Volúmen de muestra:**

Contenedores con 100 ml. o menos: filtre el contenido entero de todas las unidades indicadas

Contenedores de 100 ó 500 ml: filtre el contenido entero de las unidades indicadas.

Contenedores con más de 500 ml: filtre al menos 500 ml. de solución.

Técnica aséptica:

Se deberá usar estricta técnica aséptica durante todos los procedimientos. La prueba debe ser realizada en una campana de flujo laminar. Los analistas deberán usar cofia y uniforme limpio o bata asignada para uso exclusivo de la prueba de esterilidad.

Se deberán usar guantes estériles así como cubrebocas.

Controles negativos:

Se incubará un tubo de cada medio a la temperatura adecuada y durante todo el tiempo que dure la prueba para verificar la esterilidad del medio.

Se filtrará una muestra de un lote de referencia (cuya esterilidad esté comprobada) usando una membrana estéril y el aparato de filtración, así como las soluciones de enjuague, esto es con la finalidad de verificar la técnica seguida.

Se checará la no existencia de gérmenes en el aire del cuarto, sobre todo bajo el flujo laminar, mediante el uso de placas de exposición en los sitios estratégicos.

Cada carga de medio autoclaveado se probará para verificar su capacidad de promoción de crecimiento, inoculando por duplicado tubos de cada medio con 10 a 100 microorganismos viables de cada una de las cepas que se citan a continuación en la siguiente tabla:

Medio	Microorganismos de prueba	Incubación Temp. Condiciones
Tioglicolato	<u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	30-35°C Aerobias
	<u>C. albicans</u> ATCC 10231	30-35°C Aerobias
	<u>B. vulgatus</u> ATCC8482	30-35°C Aerobias
Soya-Caseína	<u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	20-25°C Aerobias
	<u>C. albicans</u> ATCC 10231	20-25°C Aerobias

Ejecución de la Prueba:

Las siguientes instrucciones son para el equipo - Sartorius y Millipore. Haga los cambios apropiados para equipo de otros proveedores, se usarán - membranas de 0.45 um de luz de poro.

Coloque el manifold esterilizado en la campana de flujo laminar y remueva las cubiertas de las entradas de vacío, apriete los filtros de aire de las válvulas de 3 vías. Conecte la manguera de vacío. Inspeccione si no existen membranas rotas o membranas fuera del O-ring. Remplace aquellas

que presenten defecto.

Asegúrese que cada uno de los vasos de filtración están firmemente adheridos a la base del sostén - del filtro o apriételos cuidadosamente en caso ne cesario.

Si se usan equipos con aguja para la transferen--
cia de la muestra, desinfecte los protectores de
goma de la aguja con el desinfectante adecuado, -
permita secar e inserte la aguja en el tapón de -
la botella o en puerto de entrada de la bolsa, --
cuélguela invertida y abra la llave (o pinza) del
equipo de transferencia, cuando el filtro esté --
completamente mojado, prenda el vacío a no más de
2.0 bar y abra las válvulas del manifold.

Para el caso de contenedores que contengan menos
de 100 ml., vacíe el contenido entero de no menos
de 20 recipientes (ampolletas) por membrana o mi-
dad de membrana.

En el caso de contenedores de más de 500 ml., - -
asépticamente transfiera no menos de 500 ml. de -
cada uno, por cada membrana o mitad de membrana -
usados (usar 10 recipientes).

En cada caso después de filtrar el contenido re--

querido, se enjuaga el filtro con un mínimo de --
100 ml. de solución tampón de fosfatos con adi-
ción de peptona.

Corte la membrana a la mitad (si sólo una es usa-
da) usando tijeras estériles y pinzas. Transfiera
una mitad de la membrana a 100 ml. de medio de
tioglicolato en un tubo de ensayo. Transfiera la
segunda membrana a 100 ml. de caldo de soya-caseí-
na en otro tubo de ensayo.

Dependiendo del tamaño del tubo de ensayo puede -
requerirse mayor cantidad de medio.

Asegúrese de que el filtro alcance la inmersión -
apropiada y adecuada profundidad para mentener --
una zona anaeróbica en el caso del medio de tio-
glicolato.

Incubación:

Medio fluido de tioglicolato: 30 a 35°C por no me-
nos de siete días.

Caldo de soya-caseína: 20 a 25°C por no menos de
siete días

Interpretación:

Después del periodo de incubación, examine los tu

bos para evidencia de crecimiento de microorganismos:

Prueba negativa:

Definición: No hay crecimiento, no existe turbidez en los tubos inoculados.

Acción: El artículo probado cumple los requerimientos de la prueba de esterilidad y puede ser liberado, si todos los otros criterios (anal químico, etc.) cumplen

Prueba positiva:

Definición: Crecimiento evidenciado por la aparición de turbidez en los tubos inoculados.

Acción: Si se encuentra crecimiento microbiano pero después de una revisión del monitoreo del área, de los materiales usados, del procedimiento de prueba y de los controles positivos y negativos que indiquen que los medios o la técnica fue inadecuada, entonces el primer análisis se considerará inválido y puede ser repetido. Si se observa crecimiento pero no hay evidencias que invalide el primer análisis, se procede a efectuar un segundo análisis que se considerará como reprobada.

El tamaño de la muestra es como mínimo el doble -

de la primera vez.

Los volúmenes mínimos probados de cada artículo y los medios y los periodos de incubación son los mismos que los indicados para el primer análisis.

Si después de efectuar el análisis de reprueba no se encuentra crecimiento, el artículo probado cumple los requisitos de la prueba de esterilidad. - Si se observa crecimiento, el resultado así obtenido es concluyente de que el artículo no cumple los requerimientos de la prueba de esterilidad. - Sin embargo, sí puede ser demostrado que el segundo análisis (reprueba) fue inválido a causa de falla en los medios o bien por el inadecuado uso de una técnica aséptica al realizar la prueba, entonces el segundo análisis (reprueba) puede ser repetido.

5. REGISTRO Y ORGANIZACION DE DATOS:

Registrar los datos en la siguiente forma:

REPORTE DE PRUEBA
DE ESTERILIDAD

UNAM

Lab. de Microbiolo-
gía Farmacéutica

Practica No.:

PRODUCTO:

CANTIDAD:

DETERMINACIONES

LIMITES

RESULTADOS

Esterilidad

Cumplir, pasar la prueba

ANALIZO:

FECHA:

6. ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

De acuerdo a los requerimientos de la prueba de esterilidad el producto que usted analizó ¿pasa o no pasa la prueba? En caso de que no pasara la prueba dé una explicación.

¿Por qué cree usted que la prueba de esterilidad sea tan importante en un producto inyectable?

- Explique en sus propios términos qué es el valor D
- Explique el funcionamiento de una campana de flujo laminar

¿Cuánto es el número de partículas permitidas bajo flujo laminar?

¿Por qué es importante el tamaño de poro de los filtros usados para la prueba de esterilidad?.

7. BIBLIOGRAFIA

- Akers, M.J., Attia, I.A., Avis, K.E., Understanding - and utilizing Fovalues, Pharm. Tech. 2:31-35 (May) - 1978.
- Borick, Paul M. and borick, Joan A., Sterility testing of Pharmaceuticals, Cosmetics and Medical devices, - Ethicon, Inc. Somerville, N.J.
- Bruch, C.W., Biological Indicators as degrees (Probabilities of sterilization) Chapter I; Developments in Industrial Microbiology; V 14 American Institute of - Biological Sciences. Washington D.C. P. 3-16 1973
- Caputo, R.A.; The design and Use of Biological indicators for Sterilization - cycle Validation; MD & DI, 2: 23-27, Aug 1980.
- Chinn, A.; Gamma Sterilization and Single-Use Devices; Part I, II; MD & DI, Jan 1980 p. 21-23
- De Vecchi, T.A., Training personnel to work in sterile environments; Pharm. Tech. 2: 41-44, Aug 1978.
- Gunther, D.A., The Chemistry and Biology of ETO Sterilization; MD & DI, 2: 12, Dec 1980 p. 35-35.
- Kerns, W.T.; A practical Approach to D value and Z - value Determination; Pharm. Eng.; Feb-Apr. 1981 p. 46 48, 50.
- Kleiman, L., Wertman, L. and Shlisky, T; LVP Sterilization and the proposed GMPs; Pharm. tech., 4:99-101 (Jun) 1980

- Loshbaugh, C.; Microbiological considerations for ETO sterilization; MD & DI; Jan 1980 p. 25-30.
- Mascoli, C.C.; Should End-product Sterility Testing Continue?; MD & DI Apr 1981, p. 8-9
- Murty, R., Kapoor, J., Franklin, G.; In-process controls during the manufacture of injectables; Pharm. - tech.; 1: 77-80 (Nov) 1977.
- Myers, R.B.; Practical system for validating heat sterilization processes; Journal of the Parenteral Drug Assn, September-October 1978 Vol. 32, No. 5; p. 216-231.
- Outschroorn, A.S.; Developments in compendial standards for sterility tests and their relation to sterility assurance in manufacturing control Pharm. tech. Conference 1982.
- Parenteral Drug. Assn. Validation of aseptic filling, for solution drug products. Parenteral Drug. Assn. - Technical monograph No 2 1980 27 p.
- Pflug, I. J.; Sterilization: Science, not art; MD & DI; Mar 1981 p. 8-9
- PMA position paper. Alternatives to performing finished product sterility testing of large volume parenteral solutions. 1980, 5 pages.
- Riggs, T.H.; Sterilization, Goals versus the state of the art. MD & DI; Nov. 1979, p. 18-19
- Botila, J.A.; Santasalo, N.T.; New concepts in the manufacturing and sterilization of LVP's in plastic bottles. J. Parenteral science & Technology; vol 35,

No. 4, July-Aug 1981 page 170-175

- USP XXI, United States Pharmacopeia, 71, 1211

PRUEBA # 7DETERMINACION DE PIROGENOS. PRUEBA USP EN CONEJOS.
DETERMINACION DE PIROGENOS EN UN EQUIPO DE VENOCLISIS1. INTRODUCCION:Perspectiva Histórica.

La primera infusión intravenosa registrada fue administrada por el Dr. Thomas Latta de Edimburgo, durante la epidemia de cólera de 1832. Con atención constante y frecuentes infusiones salinas, el Dr. Latta logró salvar las vidas de cinco de quince víctimas del cólera. Este triunfo dramático, comparado con remedios anteriores, aseguró el futuro para la terapia de infusión de fluidos. Los primeros practicantes de la terapia de infusión observaron que el tratamiento generalmente iba acompañado de una reacción febril característica en sus pacientes. La reacción febril se desarrolla dentro de los 30 minutos a 2 horas después de la inyección y consistía en escalofríos seguidos de fiebre con altas temperaturas persistente por varias horas.

Las respuestas febriles fueron tan comúnmente asociadas con la terapia de infusión que algunos de los primeros trabajos de investigación versaban sobre la idea de deliberadamente producir respuestas febriles por medio de la infusión para -

producir "piroterapia" en el tratamiento de enfermedades tales como artritis y sífilis.

En 1875, Sir John-Sanderson, profesor de Fisiología en el -- University College London fue el primero en usar el término "pirógeno" para describir la sustancia causante de la fiebre que se encontraba en los fluidos intravenosos. Burdon-San-- derson evidentemente se dió cuenta que los pirógenos podían ser de origen microbiano dado que su artículo escrito en -- 1876 y titulado "Acerca del Proceso de la Fiebre" planteaba cuestiones acerca de si los microorganismos o sus productos eran los responsables de producir la fiebre. Los primeros -- trabajos significativos sobre los pirógenos en soluciones -- fueron conducidos por Hort y Penfold en 1911. Estos investi-- gadores inyectaron agua recientemente destilada en hombres y animales y no encontraron cambios perceptibles en la tempera-- tura.

Sin embargo, si la misma agua era inoculada dentro de contenedores no estériles y se le dejaba permanecer por cierto pe-- ríodo de tiempo y reinyectada en hombres y animales, aparec-- cían reacciones febriles. Ellos concluyeron que la sustancia denominada "pirógeno" era un producto asociado con las bacte-- rias, pero no con los cuerpos de las mismas puesto que nin-- gun proceso de autoclaveado, hervido o filtrado podía elimi-- nar la sustancia pirogénica del agua.

Definición de Pirógeno:

Ahora nosotros sabemos que los pirógenos son verdaderamente de origen bacteriano. Son lipopolisacaridos localizados en la pared celular de las bacterias gram-negativas donde acomplejados con lípidos y proteínas forman la membrana externa de la célula. Los lipopolisacaridos consisten de tres regiones de contraste químico y propiedades biológicas. El polisacarido específico O (Región I) contiene la especificidad serológica principal y está unido al polisacarido núcleo (Región II) la cual es común en los diferentes grupos de bacterias. El núcleo está ligado al componente lípido (Región III) a través de un trisacarido, el componente lípido es llamado lípido A y es responsable de una amplia variedad de actividades biológicas.

Las bacterias pueden causar enfermedad ya sea por invasión, esto es mediante ataque y daño a las células del huésped, o bien por toxogenicidad, o sea formando toxinas que envenenan las células huésped.

Con respecto a lo primero, se conoce relativamente poco acerca de los factores involucrados a nivel molecular y del que por qué ciertas bacterias muestran tan alta selectividad hacia el tejido que invaden. Indudablemente varias defensas del huésped, incluyendo inmunidad y la integridad de los tejidos están parcialmente involucrados.

Se conocen algunas bacterias que liberan sustancias tales como hemosinas, leucocidinas, coagulosa, quinasas y hialuronidasa, las cuales pueden contribuir a promover la invasión. - Aunque estas sustancias son elaboradas por las bacterias y ejercen profundos efectos sobre el huésped, no son usualmente consideradas como toxinas bacterianas clásicas.

Las toxinas bacterianas incluyen "exotoxinas" y "endotoxinas". Las exotoxinas son proteínas producidas por algunas bacterias Gram-positivas y ciertas especies de Gram-negativas y que eventualmente son liberadas hacia sus alrededores. Las exotoxinas representan algunos de los más potentes venenos conocidos. Por ejemplo se ha calculado que 200 gr. de toxina del botulismo tipo A son suficientes para matar a la población entera de todo el mundo, un microgramo mataría - - 200,000 ratones blancos. Las exotoxinas son muy específicas en sus acciones. Muchas son neurotoxinas o causan necrosis celular, son antigénicas y cuando son tratadas con formaldehído "in vitro" su toxicidad es eliminada mientras que su antigenicidad es retenida. Las toxinas así tratadas son llamadas toxoides y son extremadamente útiles como agentes inmunizantes en seres humanos proporcionando protección duradera - en contra de las toxinas bacterianas. A continuación mencionamos unos pocos de los más importantes microorganismos productores de exotoxinas y algunas de las enfermedades que producen:

Clostridium botulinum (Botulismo), *Clostridium tetani* (Tetani), *Clostridium perfringens* (gangrena gaseosa), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Streptococcus pyogenes* (fiebre - escarlatina), *Pausteuella pestis* (Peste) y *Shigella dysenteriae* (Disentería bacilar).

Las endotoxinas se encuentran en las bacterias Gram-negativas y están asociadas con, o son idénticas a, los lipopolisacáridos presentes en la envoltura de la célula. A diferencia de las exotoxinas son estables al calor y son menos potentes y menos específicas en sus acciones, no forman toxoides (son pobres agentes inmunizantes) y no son liberadas a menos que la integridad de la célula sea mecánicamente o químicamente destruída. Las endotoxinas producen fiebre y se cree son responsables de secuelas irreversibles algunas veces (p.ej. shock endotóxicos o séptico) en infecciones severas de Gram-negativos tales como *Enterobacteriaceae* y otros. Mucho de la influencia de endotoxinas parece depender de la cantidad que se libere de ellas.

<u>COMPONENTES QUIMICOS DE LAS PAREDES CELULARES DE BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y GRAM-NEGATIVAS</u>		
	<u>Gram-Positivas</u>	<u>Gram-Negativas</u>
Aminoácidos	Tres o cuatro de los principales aminoácidos, incluyendo alanina, ácido glutámico y lisina o ácido aromáticos. Aminoácidos que no contienen sulfuro.	La mayoría de los aminoácidos encontrados en las proteínas comunes, - incluyendo ácido diaminopimélico.
Acido Murámico	Presente	Presente
Lípidos	0-2%	10-20%
Polisacaridos	35-60%	15-20%

<u>ALGUNAS DIFERENCIAS ENTRE LAS BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y GRAM-NEGATIVAS</u>	
<u>Gram-Positivas</u>	<u>Gram-Negativas</u>
<p>Contiene ribonucleato de magnesio</p> <p>Muy sensitiva a los colorantes trifenilmetano (ej.violeta - - crystal)</p> <p>Sensible a la penicilina</p> <p>No se disuelve en 1% KOH</p> <p>Punto isoeléctrico aparente -- pH2-3</p> <p>Bacilos formadores de esporas, muchos cocos (lactobacillus y - Corinebacterias)</p> <p>Toxinas (si hay): exotoxinas</p>	<p>No contiene ribonucleato - de mg.</p> <p>Menos sensitiva a los colorantes de tintes trifenilmetano</p> <p>Sensible a la estreptomici na</p> <p>Se disuelve en 1% KOH</p> <p>Punto isoeléctrico aparente pH4-5</p> <p>La mayoría bacilos no formadores de esporas, espirilos, algunos cocos.</p> <p>Toxinas: endotoxinas</p>

<u>CARACTERISTICAS GENERALES DE</u> <u>EXOTOXINAS Y ENDOTOXINAS</u>		
<u>Característica</u>	<u>Exotoxina</u>	<u>Endotoxina</u>
<u>Fuente</u>	Predominantemente pero no exclusivamente, excretadas por algunas bacterias gram-positivas	Principalmente - liberadas por la pared celular de las bacterias -- gram-negativas
<u>Naturaleza Química</u>	Proteínas	Lipopolisacáridos
<u>Sensibilidad al calor</u>	Fácilmente inactivadas a 60 - 80°C	Resistentes incluso al autoclaveado
<u>Propiedades inmunológicas</u>	Es fácilmente convertida a toxoide, fácilmente neutralizada -- por la antitoxina	No se forman toxoides neutralización ausente o más difícil de alcanzar con antitoxina
<u>Dosis letal</u>	Pequeñísima. Entre los más potentes venenos conocidos	Usualmente más grande que la de la mayoría de las exotoxinas
<u>Acción farmacológicas</u>	Generalmente específica para un tipo particular de célula o terminación nerviosa	Efectos varios, fiebre intensa, principalmente - síntomas de -- shock generalizado.

Resumiendo pues, los pirógenos son endotoxinas de bacterias gram-negativas y son sustancias nocivas, muy difíciles de eliminar ya que incluso resisten la esterilización. La única forma de controlarlas es mediante el monitoreo de la biocarga

de las soluciones parenterales.

Las endotoxinas de la membrana externa de las bacterias gram-negativas son la principal fuente de pirógenos por lo que las soluciones parenterales y los equipos intravenosos deben estar libres de ellas.

Prueba del Consejo USP:

La pirogenicidad, o fibre producida por la actividad de los lipopolisacaridos, fue primeramente usada por Florence Seibert en 1923 como un método para detectar lipopolisacaridos. Seibert usó el conejo como animal de prueba y fue la primera en sugerir que todos los fármacos debían ser probados para determinar la presencia de pirógenos por medio de monitoreo de reacciones febriles en conejos inyectados con dichos productos. La primera producción comercial de parenterales de gran volumen comenzó a principios de los años 30's con el advenimiento de la Segunda Guerra Mundial. La demanda por la terapia intravenosa de gran volumen empezó a llamar la atención hacia los problemas de los pirógenos y la necesidad de una prueba oficial que asegurara la ausencia de pirógenos en las preparaciones intravenosas. A principios de los cuarentas se llevó a cabo un estudio en colaboración de la Food and Drug Administration, el National Institute of Health y 14 compañías farmacéuticas. Como resultado de este estudio se incorporó la primera prueba oficial de pirógenos por cone

jo en la doceava edición de la USP en 1942.

La prueba consiste en la inyección intravenosa de la solución a ser probada en los conejos bajo condiciones específicas y el subsecuente registro de sus temperaturas.

Durante más de treinta años la prueba de inoculación intravenosa en conejo fué el único procedimiento confiable para la determinación de pirógenos, que era descrita en todos los formularios internacionales. En general, la prueba ha sido muy útil y, a pesar de la elaborada naturaleza de la prueba, su alto costo, problemas de ejecución y la variabilidad característica de todos los sistemas biológicos, sigue siendo aún la única prueba válida oficialmente para la mayoría de los productos parenterales.

2. OBJETIVOS:

Describir el método de determinación de pirógenos por conejo. El alumno será capaz de:

- Determinar la pirogenicidad a un equipo usando el método USP
- Adquirir experiencia en el manejo de animales de labora

torio.

- Entender la definición de "pirógeno" y las razones por las cuales todas las soluciones y preparados parenterales deben estar exentos de ellos.

3. HIPOTESIS:

La prueba en conejo USP consiste en inyectar un volumen prescrito de solución intravenosamente dentro de la vena marginal de la oreja de conejos y observar la temperatura de los conejos por medio de termopares rectales durante las tres horas siguientes a la inyección. Si la solución inyectada contiene pirógenos, se observará un incremento en la temperatura de los conejos. Si la solución está libre de pirógenos no se observará incremento de temperatura en los conejos.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

4.1 Materiales:

Jeringas despirogenizadas

Agujas no pirogénicas

Material de vidrio limpio y despirogenizado

Registrador de temperatura automático (Kaye Digestrip)

Termopares para conectarlos al registrador

Cepos de madera o de acero inoxidable para los conejos

Baño maría para calentar la solución

4.2 Reactivos:

Agua destilada no pirogénica

Solución salina 0.9% no pirogénica

4.3 Técnica:

Animal de prueba:

Use conejos maduros, saludables, que pesen no menos de 2.2 kgr. los conejos deberán tener periodos de descanso entre pruebas de por lo menos 72 hrs.

Si cualquier animal ha sido usado para una prueba anterior de pirógenos que haya dado como resultado una respuesta en su temperatura de 0.6°C o más, el animal no puede ser usado hasta después de un periodo de descanso de dos semanas. Cuando una muestra bajo prueba haya resultado pirogénica todos los animales usados durante la prueba de esa muestra deberán tener un periodo de descanso de dos semanas.

Calibración del registrador de temperatura:

El aparato registrador deberá ser calibrado mensualmente a tres temperaturas contra un termómetro certificado de la DGN, el cual haya sido conectado a un baño de temperatura constante equipado con un regulador que permita una diferencia de 0.01°C. -

Los termopares o bulbos de resistencia son sumergidos dentro del baño de modo que no toquen los lados o el fondo, a una profundidad estándar de 9 - 12 cm. Una variación de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ con respecto al termómetro de la DGN es aceptable.

Un termopar que tenga una diferencia de $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ de variación debe ser reemplazado. Checar los termopares a 37°C , 39°C y 41°C . Los termopares también deben ser checados para determinar que la lectura máxima es alcanzada en menos de 5 minutos.

Calibración de los hornos y baños de agua:

Monitoree el horno despirogenizador y el baño de agua para calentar botellas, diariamente con un termómetro o termopar que haya sido calibrado contra un estándar de la DGN. La temperatura del horno despirogenizador debe alcanzar un mínimo de -250°C . La temperatura del baño debe ser de $37^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$.

Despirogenización del equipo:

Coloque las jeringas, agujas y material de vidrio que se vaya a usar para la prueba en un horno a -250°C por no menos de 30 mins. Registre la temperatura del horno y el periodo de tiempo que el

equipo está en el horno (también pueden usarse jeringas y agujas desechables estériles no pirogénicas).

Cuidado de los bulbos y termopares:

Después de cada uso los termopares o bulbos se limpian primero con pañuelo desechable para quitar el material fecal, después se limpian con una franela saturada con jabón y agua y finalmente se limpian con alcohol al 70% (etanol o isopropanol).

Preparación de la muestra:

El equipo de venoclisis que va a ser analizado se llena con solución salina o agua destilada (no exceder 40 ml) tan completamente como sea posible, cuidando de no tocar las superficies externas, sobre todo si el equipo sólo tiene superficies interiores esterilizadas (ver el marbete). Deje permanecer la solución por lo menos una hora a temperatura ambiente 15-30°C o 15 minutos a 37°C. Drene el equipo sobre un vaso de precipitados despirogenizado y si es necesario caliente la solución a ser probada en un baño de temperatura constante el tiempo suficiente para asegurar una temperatura de 35-39°C al momento de la inyección.

Preparación de los conejos para la prueba:

Se colocan tres conejos en los cepos, uno enseguida de otro. Los bulbos de resistencia o los termopares se cubren con vaselina y se insertan de 7.5 a 10 cm. dentro del recto de los conejos y se aseguran con cinta adhesiva o equivalente (de por lo menos 1/4" de ancho o bien puede ponerse un listón y amarrarlo al rabo de los conejos. Se debe tener cuidado en la inserción de los termopares. Si el conejo parece particularmente nervioso o si se nota una respuesta pirogénica, la posición del bulbo debe ser checada dado que los bulbos o termopares son delicados y por lo tanto deberán ser tratados en forma delicada y no brusca.

Período de estabilización:

Se permitirá estabilizar a los conejos por lo menos 30 minutos antes de que empiece la prueba. Se mide la temperatura de los conejos después de que se haya completado el período de estabilización y se registra. Sólo aquellos conejos cuya temperatura inicial sea de 38.9 - 39.8°C deben ser usados.

Inyección de los conejos:

Cada animal es inyectado dentro de los 30 minutos

siguientes a los que la temperatura inicial fue registrada. Para iluminar las venas se puede usar - una lámpara a contra luz, el sitio de inyección es desinfectado con alcohol al 70% (etanol o isoprop^oanol). Se deben lavar las manos con agua y jabón - antes de preparar la muestra para la prueba, si se usan guantes para manejar los conejos, removerlos antes de lavarse las manos.

A continuación se inyectan 10 ml de muestra (solu- ción salina proveniente del equipo) por cada kilo- gramo de peso del conejo intravenosamente en la vena marginal. La velocidad de inyección debe con- trolarse de tal manera que la inyección total de - la muestra no tarde menos de 2 ni más de 10 minu- tos.

Registro de temperaturas:

Las temperaturas son registradas en la carta del - Digestrip y se imprimen en los siguientes periodos: 1, 1 1/2, 2 y 3 horas después de la inyección. Si uno de los termopares rectales es rechazado por un conejo en uno de los momentos de registro, esperar aproximadamente cuatro minutos después de recolo- carle el termopar al animal antes de leer y regis- trar la temperatura del conejo. Esto le dará - -

tiempo al conejo para recuperarse de la hipotermia inicial. La temperatura inicial y el máximo cambio en la temperatura (hacia arriba o hacia abajo) se anota también en la tarjeta histórica del conejo, así como el lote, nombre de la solución/equipo probado.

Interpretación de resultados:

La temperatura control tomada antes de la inyección constituye la temperatura normal del animal individual para la prueba a partir de la cual los cambios subsecuentes son debidos al material a ser probado.

PRUEBA DE TRES CONEJOS

Cambios en temperatura

No más de un conejo muestra un incremento de 0.4°C o más. Ningún conejo muestra un incremento de 0.6°C o más y la suma de los tres conejos es menor a 1.2°C

Cualquier conejo individual muestra un incremento de 0.6°C o más

Dos conejos muestran cada uno un incremento de 0.4°C o más

La suma de los tres conejos es de 1.2°C o más

Disposición

Pasa la prueba

Repetir la prueba en 5 conejos adicionales

Repetir la prueba en 5 conejos adicionales

Repetir la prueba en 5 conejos adicionales

5. REGISTRO Y ORGANIZACION DE DATOS:

Anote las temperaturas de los conejos en la tabla siguiente: el reporte de prueba de pirógenos constituye el récord original, los datos del Kaye deben ser pasados a este formato, -- aunque las gráficas del Kaye deben ser guardadas como parte del récord original.

REPORTE DE PRUEBA DE PIROGENOS
CONEJO

UNAM

Lab. de Microbio-
logía Farmacéutica

Práctica No.

NOMBRE DEL PRODUCTO:				
	T=1 Hr.	T=1 1/2 hr	T=2 Hr	T=3 Hr
Conejo No. _____ T. inicial _____ Diferencia $T_n - T_i$ Peso: _____ Dosis (ML) Inyectada: _____ Tiempo iny.: _____				
Conejo No. _____ T. inicial _____ Diferencia $T_n - T_i$ Peso : _____ Dosis (ML) Inyectada: _____ Tiempo int.: _____				
Conejo No. _____ T. inicial _____ Diferencia $T_n - T_i$ Peso: _____ Dosis (ML) Inyectada: _____ Tiempo int.: _____				
ANALIZO:		FECHA:		
RESULTADO:	PASA ()	REANALISIS ()	NO PASA ()	

OBSERVACIONES:

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

¿Qué es perogeno?

¿A qué se debe que se eleve la temperatura en los conejos --
y en las personas con los perogenos?

¿Qué lo ocasiona?

¿Cuál es la razón de esperar 30 minutos antes de tomar la --
temperatura inicial a los conejos después que se les ha colo
cado los termopares?

¿Cuál es la razón de poner a los conejos en un cepo?

¿El equipo que usted analizó pasa o no pasa la prueba? ¿Por
qué?

¿Porqué al preparar la muestra y ser llenado el equipo con
solución salina se deja reposar durante una hora?

¿Porqué se tiene que calentar la solución de prueba a 35-39°
C. antes de inyectarla a los conejos?

¿Qué cuidados cree usted que deban de tenerse para el área -
de pruebas en el momento en que ésta es efectuada?

7. BIBLIOGRAFIA

- Antibiotics: in historical perspective. Merck, Sharp & Dohme International. 1981.
- Cooper, James F.; Pyrogen Technology, P & MC Industry Sep-Oct 1982. pg 43-44, 63-64
- Davis, Bernard et al; Microbiology 2dn ed.; Harper & Row Publishers, Inc. 1973 pg. 638-639, 765
- USP XXI United States Pharmacopeia.
- Wachtel, R.E., Comparison of LAL and correlation with the USP pyrogen test; Appl. Env. Microbiology, Vol 33 June 1977

PRACTICA # 8

DETERMINACION DE PIROGENOS. PRUEBA DEL
LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS
PROCEDIMIENTO POR DENSIDAD OPTICA
DETERMINACION DE PIROGENOS EN SOLUCION SALINA AL 0.9%

1. INTRODUCCION:

La prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* es reconocida en la literatura como el método más sensitivo y conveniente, actualmente disponible, para detectar endotoxinas bacterianas, las cuales son la causa principal de la pirogenicidad. Por esta razón la prueba tiene gran utilidad como una herramienta de control de calidad de los productos parenterales y de equipos.

La prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) está basada en el mecanismo de coagulación del cangrejo herradura, *Limulus polyphemus*. Cuando el cangrejo es herido la exposición a bacterias gram negativas y sus endotoxinas ocasiona que sus células sanguíneas, llamadas amebocitos, se agreguen para formar una cadena en torno a la cual se forma un gel -- protéico.

La prueba de LAL usa extractos de estas células para efectuar la determinación de endotoxinas.

Limulus polyphemus, el cangrejo herradura de Norteamérica, -

forma parte de un grupo de arácnidos marinos que se encuentran a lo largo de las costas occidentales del Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es un artrópodo muy antiguo aparentemente emparentado con los trilobites.

La coagulación intravenosa en el cangrejo herradura fue reportada por primera vez por Loeb en 1902. En 1956, Fredrick Bang, hizo un reporte muy completo acerca de una enfermedad que atacaba al cangrejo herradura la cual terminaba en una coagulación vascular total y la muerte del cangrejo. La muerte ocurría más bien debido a la coagulación intravascular que por infección sistémica. Pero no fue sino hasta 1964 que Levin y Bang demostraron que la etiología de esta enfermedad era una endotoxina.

En 1968 Levin y Bang encontraron que la reacción de coagulación era debida a una reacción enzimática para la que se requería la presencia de endotoxina y proteínas gelificantes encontradas en los amebocitos circulantes.

En 1971 Cooper, Levin y Wagner publicaron los resultados de sus estudios usando lisados para detectar endotoxinas en radiofármacos. En subsecuentes trabajos de Cooper y de otros investigadores se comprobó la confiabilidad de la prueba, -- así como se extendió su uso para detectar endotoxinas en una amplia variedad de productos parenterales. Nuevos usos para la prueba del lisado se demostraron en trabajos llevados a --

cabo por diferentes investigadores (Levin, Reinhold, Liehr, Yin, Nachum y Jorgensen) quienes confirmaron la eficacia de la prueba para detectar endotoxinas en diferentes fluidos -- del cuerpo.

Levin y Bang fueron los primeros en sugerir que la reacción de gelación en presencia de endotoxina del lisado de amebocitos de *Limulus* era iniciada enzimáticamente. El mecanismo de reacción involucra la activación de una enzima pro-gelación presente en el lisado y la cual es activada por endotoxinas bacterianas en presencia de iones divalentes de calcio.

Esta enzima una vez activada cataliza el rompimiento hidrolítico de proteínas coagulables del lisado, llamadas coagulógenos dando lugar a subunidades polipeptídicas, dos de las cuales se combinan para formar una matriz protéica (Gel).

La naturaleza química del coagulógeno y sus subunidades gelificadas fueron extensamente estudiadas tanto en *Limulus polyphemus* como en *Tachypicus tridentatus* (una especie de cangrejo herradura encontrado en el mar del Japón el cual tiene la misma respuesta ante las endotoxinas que el cangrejo *Limulus*).

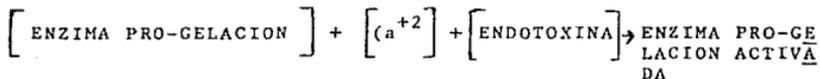
En el *Limulus* el polipéptido coagulógeno está compuesto de aproximadamente 215 aminoácidos. La gelificación ocurre seguido del rompimiento de un péptido de 45 aminoácidos en el --

extremo carboxilo de la cadena para dar un péptido soluble - "C" y un péptico insoluble de aproximadamente 170 residuos - de aminoácidos. El péptido insoluble llamado coagulágeno o coagulina lleva a cabo una reacción de polimerización, formando enlaces sulfuro entre las dos cadenas que lo forman -- (A y B) y dando como resultado un gel estable.

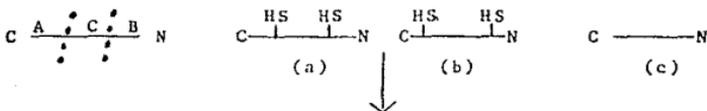
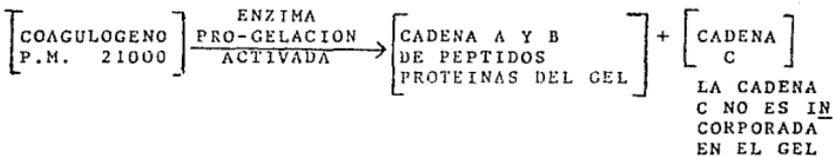
La preparación del reactivo LAL (Lisado de Amebocitos de Limulus) se lleva a cabo colectando la sangre completa de especímenes saludables de cangrejo herradura. La sangre tiene una apariencia de color azul gris debido a la hemocianina -- presente en el plasma. La sangre completa es centrifugada -- para separar los amebocitos. Posteriormente el plasma es -- expelido y descartado, entonces las células son cuidadosamente lavadas y finalmente lisadas (usualmente se hace osmóticamente con agua destilada). El lisado celular resultante es colocado dentro de viales y liofilizado. Este liofilizado -- una vez reconstituído al momento de su uso es un indicador -- sumamente sensitivo de la presencia de endotoxinas bacterianas.

La prueba de LAL consiste en combinar cantidades fijas de -- reactivo de lisado de limulus reconstituído con una muestra de la solución a ser probada, incubando por un periodo específico de tiempo y checando después del periodo de incubación la muestra para ver si hay evidencia de la formación de un gel protéico.

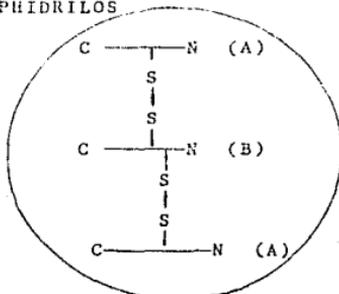
REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA REACCION DE GELACION



La enzima activada cataliza el rompimiento del coagulogeno - en subunidades polipeptidicas.



OXIDACION DE LOS GRUPOS SULPHIDRILOS



MATRIZ DEL GEL PROTEICO CON ENLACES DISULFURO

La sensibilidad de la prueba puede ser incrementada estimando el grado de viscosidad o granulaci3n en la parte de la muestra no gelificada o bien midiendo la turbidez por t3cnicas de absorci3n o dispersi3n de luz.

La especificidad de la prueba LAL ha sido un tema controversial de particular inter3s para las compa1as que manufacturan productos farmac3uticos. Respecto a 3sto, hasta la fecha, no ha sido confirmado ning3n otro activador no-espec3fico para la prueba de LAL. En 1974 Wildfeuer report3 que un p3ptidoglicano que hab3a sido aislado de membranas celulares de bacterias gram-positivas induc3a la reacci3n de gelaci3n a niveles 1000 veces menos potentes que los alcanzados por endotoxinas. Sin embargo, las bacterias gram-positivas no causan gelaci3n y sus exotoxinas son l3biles al calor y son destruidas durante el proceso de autoclaveado. En lo que concierne a la idea ampliamente extendida de que pueda haber activadores no espec3ficos de la reacci3n de gelaci3n podemos afirmar que parece ser infundada y a menos que se demuestre lo contrario, uno debe asumir que un resultado positivo de la prueba de limulus en producto es indicativo de contaminaci3n con endotoxinas bacterianas.

Diversos materiales interfieren con la detecci3n de endotoxina por el m3todo LAL. Como se mencion3 anteriormente, la gelaci3n de las prote3nas coagulables en el lisado es aparentemente catalizado por una enzima. La enzima pro-gelificaci3n

presente en el reactivo LAL es muy similar a la tripsina -- (una proteasa).

El di-isopropil fluorofosfato y otros inhibidores de la tripsina demostraron también inhibir la reacción de gelación.

Por otra parte, la enzima pro-gelación es al igual que la -- tripsina, lábil al calor y pH-sensitiva. De ahí que, cualquier material conocido como denaturalizador de proteínas o inhibidor de la acción de la enzima, deberá ser considerado como un potencial inhibidor o modificador de la gelificación del LAL.

Por esta razón es necesario calificar cada nuevo producto an tes de someterlo a evaluación de pirógenos por el método de LAL. Esto se puede hacer agregando cantidades graduadas de endotoxina al producto y confirmando los niveles esperados - de gel protéico resultantes de la reacción con el LAL. Frecuentemente los problemas de inhibición pueden ser resueltos por dilución del material o bien mediante ajuste del pH.

Hasta hace poco tiempo la prueba de pirógenos por conejos -- USP había sido usada como la única prueba oficial para la de tección de pirógenos en drogas y equipos y es dependiente -- del grado de sensibilidad de los conejos usados en una prueba particular. La prueba de Limulus puede ser usada como una - prueba varias veces más sensitiva que la prueba de pirógenos por conejo para pruebas de análisis en proceso y para la li-

beración del producto, así mismo la prueba del LAL puede ser usada para determinar pirógenos en productos que previamente no podían ser probados por conejo debido a la toxicidad de los mismos para los conejos o por tratarse de depresores del Sistema Nervioso Central.

Debido a su mayor sensibilidad y/o compatibilidad con un producto tóxico para los conejos, la prueba del LAL puede ayudar a asegurar productos de más alta calidad que cuando únicamente se contaba con la prueba de conejos.

Actualmente la prueba para la determinación de endotoxinas bacterianas LAL está incluida en la USP XXI (1985).

Antes de que la prueba del Lisado de Amebocitos de *Limulus* pueda ser usada para reemplazar la prueba de pirógenos por conejo en cualquier producto terminado se deberá obtener primeramente la debida autorización por parte de la SSA.

El método consiste en lo siguiente:

Al combinar 0.1 ml. de lisado con 0.1 ml. de la muestra a ser probada, la cantidad de endotoxinas presentes en la muestra activarán cierta cantidad de enzima pro-gelación, la cual a su vez ayudará a la formación de cierta cantidad de gel protéico.

La cantidad de proteína en el gel está relacionada con la cantidad de endotoxina presente en la muestra. Usando el mé

todo de Lowry para determinación de proteínas y una curva patrón de endotoxina, la cantidad de endotoxina presente en la muestra puede ser cuantificada.

Para eliminar la posibilidad de resultados "falsos negativos" debido a inhibición de la reacción por la formulación de la muestra y resultados "falsos positivos" debidos a contaminación durante el procedimiento de prueba se corren en cada ocasión tanto controles positivos como controles negativos.

2. OBJETIVOS:

Describir un método para la determinación cuantitativa de la endotoxinas bacterianas usando una técnica "in vitro" (Prueba del Lisado de Amebocitos de Limulus) como una alternativa para la determinación de pirógenos por conejo.

El alumno será capaz de:

- Usar un método cuantitativo para la determinación de endotoxinas bacterianas por el método del LAL.
- aplicar sus conocimientos sobre Biología Celular
- recordar la definición de "pirógeno" y las razones por las cuales todas las soluciones y preparados parenterales deben estar exentos de ellos
- entender el fundamento de la prueba del LAL

- recordar los conceptos fundamentales de espectrofotometría (Ley de Labert y Beer, Absorbencia, Transmittancia, etc.)

3. HIPOTESIS:

Dado que el lisado de amebocitos de *Limulus* se gelifica en presencia de encerotoxinas:

Si la muestra examinada contiene pirógenos se observará la presencia de un coagulo o gel en los tubos; como la --- cantidad de gel formada es proporcional a la cantidad de en dotoxina presente; si la muestra contiene mayor cantidad de enastoxina que la del estandar permitido, el gel formado -- será más grande; si contiene una cantidad menor que el es-- tandar la cantidad de gel formada será más pequeña.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

4.1 Materiales:

Horno de secado a 250°C

Monitorear el horno para despirogenizar diariamente con un termómetro o termopar con aparato registrador el cual haya sido calibrado contra un estándar de la DGN. La temperatura del horno debe alcanzar un mínimo de 250°C.

Balanza analítica

Con precisión hasta de 0.001 g.

Baño María de 37°C

Monitorear el baño de agua diariamente con un termómetro o termopar con aparato registrador, el cual haya sido calibrado contra un estándar de la DGN, la temperatura del agua del baño debe estar a 37°C \pm 1.0°C

Centrífuga

Centrífuga clínica IEC (modelo # C1450, S/P) o equivalente. Monitorear la velocidad de la centrífuga mensualmente con un tacómetro de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El mínimo de --

RPM aceptable para la velocidad más alta (#7) de la centrífuga IEC es de 2600 RPM, si este criterio no se cumple, el instrumento debe ser reemplazado o reparado.

Espectrofotómetro

Gilford 300 N, Stasar II o Stasar III calibrado

Mezclador Vortex

Pipetor Oxford de 200 microlitros

modelo # 8200 o equivalente, puntas desechables para el pipetor (# de parte 810)

Pipetor Cornwall B-D

modelo # P5 173-1, S/P o equivalente

Pipetor Oxford de 100 microlitros

Con puntas estériles desechables

Papel aluminio, parafilm, toallas desechables, alcohol al 70% y una solución desinfectante adecuada para limpiar la superficie de las áreas de trabajo.

Bomba de vacío

para la aspiración del sobrenadante de proteína no precipitado.

Cronómetro o Timer

para tomar el tiempo de la reacción de Lowry

Tijeras y pinzas

Despirogenizadas

Gradillas

con aberturas para tubo de 12 x 12 mm o de 15 x 15 mm.

Jeringas

desechables, no pirogénicas de 1.0 ml. con aguja - de calibre # 25 x 5/8 in. de largo

Pipetas de vidrio

estériles, no pirogénicas de 0.1, 0.2, 1.0 y 5.0 - ml.

Material de Vidrio

matraces volumétricos de 100, 500 y 1000; matraces erlenmeyer de 50 y 125 ml; probetas graduadas de 50 y 100 ml.; vasos de precipitados de 30 y 50 ml.; tubos de ensayo de 10 x 75 mm y tubos de 15 x 85 - mm.

Todo el material de vidrio (excepto los tubos de -

ensayo desechables) debe ser enjuagado dos veces - con agua destilada y si se va a usar en la prueba del LAL durante la etapa de la formación del gel, debe ser despirogenizado como sigue:

- A. Los tubos de ensayo en gran cantidad se envuelven en papel aluminio, en capa sencilla.
- B. Los matraces erlenmeyer, los matraces volumétricos y los de precipitados se envuelven con papel aluminio de forma que la boca quede totalmente cubierta.
- C. Las pipetas son envueltas individualmente o colocadas sin envolver en un recipiente adecuado con tapa.
- D. Los tapones de los matraces volumétricos se envuelven en papel aluminio, individualmente.

Una vez envuelto el material de vidrio, es despirogenizado durante 60 min. como mínimo en un horno - mantenido a una temperatura de 250°C como mínimo.

El material de vidrio usado en la determinación de proteínas por el método de Lowry, no necesita ser despirogenizado.

4.2 Reactivos

Lisado de amebocitos de Limulus:

Los viales liofilizados del lisado de amebocitos - de *Limulus* deben ser mantenidos en refrigeración - entre 2-8°C hasta su uso. Evítese la exposición - innecesaria a temperaturas arriba de 8°C. P. ej. - Pyrogent de Mallinckrodt

Solución de sulfato cúprico pentahidratado al 0.5% (p/V):

Añada 0.5 g. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a un matraz volumétrico de 100 ml., lleve hasta la marca con agua destilada, mezcle bien. Esta solución debe ser preparada fresca cada semana y descartada al final de cada semana. Puede ser almacenada a temperatura ambiente.

Solución de Carbonato de sodio al 2% (p/v) y tartrato de sodio y potasio al 0.02% (p/v) en NaOH -- 0.1 N:

A un matraz volumétrico de 1000 ml., añada 20 g. - de Na_2CO_3 y 0.2 gr. de tartrato. Lleve hasta la - marca con hidróxido de sodio 0.1N, mezcle bien. Esta solución debe prepararse fresca cada semana y - descartarse al final de cada semana. Puede ser al - macenada a temperatura ambiente.

Reactivo de Lowry:

Lleve hasta la marca un matraz volumétrico de 50 ml. con solución de carbonato al 2% y tartrato de sodio y potasio al 0.02% en NaOH 0.1 N, añada 1 ml. de sulfato de cobre al 0.5% y mezcle bien. Si ésta no es una cantidad adecuada de solución para trabajar en el día, prepare volúmenes mayores usando la misma proporción. Prepare esta solución fresca diariamente.

Reactivo de Folin-fenol:

Usar la solución 2N de Fischer-Scientific (SO-P-24) o un equivalente. El reactivo debe tener una fecha de caducidad o, en caso contrario éste sólo podrá ser usado hasta dos años después de la fecha de manufactura.

Prepare el reactivo de trabajo de Folin-fenol (1N en ácido) pipetando 25 ml. de agua destilada en un matraz volumétrico de 50 ml. y diluyendo hasta la marca con el reactivo de Folin-fenol. Mezcle bien. Esta solución debe ser preparada fresca cada semana y descartada al final de cada semana. El reactivo es foto-reactivo y debe ser guardado a temperatura ambiente en la oscuridad.

Solución de hidróxido de sodio 0.75 N:

Diluya 75 ml. de NaOH 10 N en un matraz aforado de

1000 ml., con agua destilada, mezcle bien y afore hasta la marca. Esta solución también puede prepararse pesando la cantidad adecuada de NaOH y aforando hasta la marca con agua destilada.

Solución estándar de proteína humana:

Usar un vial de "Human Protein Standard" (Human Serum Albumin) de la marca "Dade"; para reconstituir el vial cheque el valor del ensayo para el lote -- particular, el cual viene expresado en cada paquete.

Sustituya el valor del ensayo en la fórmula que se da a continuación para calcular el valor de reconstitución de ese lote de HSA (Human Serum Albumin). El resultado se obtiene en ml. Añadiendo esa cantidad de agua destilada al vial de Albumina Sérica Humana se obtiene una concentración final de 8.0 - gr. HSA por 100 ml. Esta es la concentración de la solución estándar de proteína humana y debe ser refrigerada entre 2-8°C, esta solución dura un mes.

Cálculos:
$$X = \frac{(0.02) Y}{0.08}$$

Donde: X = Cantidad de agua destilada que se debe añadir a un vial de HSA para obtener una concentración final de 8.0 - gr. HSA por 100 ml.
 Y = Valor del ensayo del lote de HSA - - (que viene en el inserto del paquete) expresado en g/100 ml.

En caso de no conseguir HSA de la marca DADE se puede usar en su lugar: Hyland Euminate (Normal Serum Albumin) o Albúmina en polvo (materia prima). Preparar la solución estándar mensual pesando 8.0 gr. y diluyendo a 100 ml. con agua destilada en un matraz volumétrico.

Solución de trabajo de proteína humana:

(Concentración = 160 microgramos/0.2 ml. o 0.800 - mg/ml)

Pipetar 1.0 ml. de la solución estándar de proteína humana mensual en un matraz volumétrico de 1000 ml y dilúyase hasta la marca con NaOH 0.75 N, mezclar bien. Prepare esta solución cada dos semanas, almacénese en refrigeración entre 2-8°C.

Estándar mensual de endotoxina (conc. = 0.5 mg/ml)

Reconstituir un vial de 1.90 mg. de endotoxina E. coli marca DIFCO (código = 108 o 106) con 2.0 ml. de agua para inyección, estéril no pirogénica.

Mezcla la solución vigorosamente y deje reposar en el refrigerador al menos una noche antes de usarla para preparar la solución mensual de 5.0 microgramos/ml. Esta solución debe ser preparada el primer día de trabajo de cada mes. Consérve en refri

geración.

Solución estándar semanal de endotoxina (conc. - -
0.01 microgramos/ml.):

Esta solución se prepara al diluir 1.0 ml. del estándar mensual de endotoxina (conc. 5.0 microgramos/ml) a 500 ml. con agua para inyección estéril no pirogénica. Todas las diluciones diarias subsecuentes, serán preparadas a partir de esta solución semanal. Refrigere esta solución de endotoxina inmediatamente después de su preparación y después de su uso.

4.3 Reactividad y Toxicidad de Substancias:

Sales de cobre: causan dermatitis, irritación de la nariz, cirrosis del hígado. La ingestión puede producir náuseas, vómitos y diarrea.

Alcohol etílico: provoca irritación de ojos, dolor de cabeza, vértigo, somnolencia, confusión mental, temblores y fatiga. Es depresivo del sistema nervioso central. La concentración máxima permisible en aire es de 1900 mg/m³.

Hidróxido de sodio: polvo o lentejas corrosivas. Se combina con los tejidos formando albuminatos alcalinos, evítese el contacto con la piel, ya que -

provoca quemaduras dérmicas, en caso de accidente, lavar la región afectada con abundante agua. La concentración máxima permisible es de 2 mg/m^3 en el aire.

4.4 Técnica:

Reconstitución del lisado: reconstituya el lisado usando el disolvente y la cantidad indicada por el fabricante, mezcle suavemente el disolvente y gire el vial de forma muy suave hasta obtener una solución homogénea. No agite el lisado porque la agitación puede provocar la formación de espuma. Se recomienda reconstituir el lisado, justo antes de su uso y reconstituir sólo la cantidad suficiente para que se agote en un sólo día de trabajo. El lisado reconstituido puede ser guardado en refrigerador entre $2-8^\circ\text{C}$ durante un día.

Curva estándar de albúmina: Para prepara la curva estándar de albúmina se diluye el estándar de trabajo bisemanal (160 microgramos/0.2 ml) en la proporción: 1:2 (Volumen del estándar/volumen total), 1:4 y 1:8 con NaOH 0.75 N para obtener concentraciones de proteína de 80 microgramos/0.2 ml, 40 microgramos/0.2 ml y 20 microgramos/0.2 ml, y se usa además la concentración inicial del estándar bise-

manal de trabajo de 160 microgramos/0.2 ml.

Todas estas preparaciones se preparan diariamente a partir del estándar bisemanal. Ejemplo:

Concentración de HSA:	microgramos/0.2 ml.			
	20	40	80	160
Cant. estándar bisemanal usado:	0.5 ml	1.0 ml	2.0 ml	4.0 ml
Cant. NaOH 0.75 N usada:	3.5 ml	3.0 ml	2.0 ml	- o -

Controles positivos:

Soluciones diarias de trabajo de endotoxina: preparar las siguientes tres diluciones de endotoxina para la determinación de la curva estándar para cada producto que vaya a ser probado (muestras diferentes con exactamente la misma composición química - pueden ser analizados con la misma determinación de curva estándar).

- A. 200 pg/ml - Diluya 2.0 ml de la solución estándar semanal de endotoxina en un matraz volumétrico de 100 ml, usando el disolvente apropiado. Mezclar bien.
- B. 50 pg/ml - Diluya 0.5 ml de la solución estándar semanal de endotoxina en un matraz volumétrico de 100 ml. usando el disolvente apropiado. Mezclar bien.

La temperatura óptima para la reacción es entre 37 y 39°C y el pH óptimo es entre 6 y 7.5. Un resultado positivo está indicado por la formación de un precipitado protéico usualmente en la forma de un coágulo sólido gelificado el cual permanece firme y junto cuando el tubo de prueba es invertido 180°C.

C. 12 pg/ml - Diluya 0.12 ml de la solución estándar semanal de endotoxina en un matraz volumétrico de 100ml. usando el disolvente adecuado. Mezclar bien.

Como disolvente, deberá usarse una solución estéril, no pirogénica, teniendo la misma formulación química que las soluciones a ser probadas. La densidad óptica de la solución usada como disolvente deberá ser menor a 0.2, o sea, si la solución a ser probada es una salina al 0.9%, el disolvente para la curva estándar, deberá ser una solución salina estéril, no pirogénica al 0.9% y cuya densidad óptica cuando fue probada con este método fue menor a 0.2.

Las tres diluciones deberán ser preparadas inmediatamente antes de su uso. No permita que pase más de una hora antes de su uso porque la endotoxina purificada es inestable y se adhiere al vidrio, con lo cual se invalidaría la curva.

Controles negativos:

Cada vial de lisado y el disolvente usado para rehidratar el lisado deberá ser chequeado para descartar una posible contaminación, mediante el uso de controles negativos. La misma solución usada para

la determinación de la curva estándar de los controles positivos se usa también para preparar la determinación de los controles negativos.

Obtención de la muestra:

Con la finalidad de prevenir una posible contaminación con bacterias y endotoxinas se deberá seguir - una técnica aséptica a lo largo de todo el procedimiento de muestreo.

Como muestras se emplearán dos soluciones salinas en diferente presentación: una en frasco y otra - en bolsa plástica, de preferencia de distinta marca comercial.

La bolsa de plástico deberá ser muestreada a través del sitio de inyección usando una jeringa desechable, estéril, no pirogénica, de 1 ml. con una aguja calibre 25 x 5/8 in. de largo.

En el caso del frasco se deberá remover la tapa metálica y se extraerá la muestra con una jeringa de sechable, estéril, no pirogénica de 1 ml.

Se deberá usar una jeringa por cada muestra. La - misma jeringa puede ser usada en la misma muestra para obtener muestras por triplicado.

Procedimiento de prueba:

Con la finalidad de prevenir una posible contaminación con bacterias y endotoxinas se deberá seguir una técnica aséptica a lo largo de todo el procedimiento de prueba.

Coloque en una gradilla una serie de tubos de ensayo despirogenizados (10 x 75 mm).

Coloque las siguientes soluciones para cada formulación de producto a ser probada:

- a) tres tubos de control negativos
- b) tres tubos para la muestra de solución salina - en bolsa
- c) tres tubos para la muestra de solución salina - en botella
- d) un tubo para la solución de endotoxina de 200 - pg/ml
- e) tres tubos para la solución de endotoxina de 50 pg/ml
- f) un tubo para la solución de endotoxina de 12 -- pg/ml

Pipetee 0.1 ml. de cada solución en su tubo respectivo. Reconstituya el lisado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Si se requiriera más de

un vial, el contenido de los viales del lisado deberá ser mezclado en un vaso de precipitados despirogenizado. Pipetee 0.1 ml de lisado en cada tubo use el pipetor de 0.1 ml con una punta estéril. Para colocar el lisado primero añada el lisado a los tubos conteniendo los controles negativos, después proceda con los tubos conteniendo las muestras y finalmente agregue el lisado a los controles positivos conteniendo endotoxinas comenzando con la menor concentración y terminando con la concentración más alta de endotoxina.

Coloque parafilm en cada tubo individualmente, mezcle dando un movimiento suave a cada tubo y colóndolo en la gradilla, de manera que no haya formación de espuma en ninguna de las soluciones. Incube los tubos en un baño de agua a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por una hora. No mueva los tubos ni los perturbe durante este período. Los tubos conteniendo endotoxina deben ser incubados en el mismo baño de agua, al mismo tiempo que los tubos de muestra, así como los controles negativos.

Saque los tubos del baño de agua.

Centrifugue al máximo de velocidad por un tiempo -

mínimo de 10 min. Remueva el sobrenadante mediante aspiración al vacío como sigue: Prenda la bomba - de vacío a baja velocidad de modo que permita aspirar el sobrenadante sin perturbar el gel. Sostenga cada tubo verticalmente o ligeramente inclinado y - cuidadosamente remueva el sobrenadante usando una pipeta pasteur desechable, la cual se conecta a la bomba de vacío con un tubo de hule.

Disuelva el gel en cada tubo añadiendo 0.2 ml. de NaOH 0.75 N (las muestras pueden permanecer hasta tres horas después de este paso. En este momento prepare dos blancos de proteína y los estándares de proteína. Pipete por duplicado, 0.2 ml. de cada - una de las soluciones conteniendo 20 microgramos, 40 microgramos, 80 microgramos y 160 microgramos - de estándar de proteína humana en 0.2 ml.; dentro de tubos de ensayo de 10 x 75 mm. Los blancos son tratados en la misma forma que los estándares y -- las muestras sólo que contienen 0.2 ml. de NaOH -- 0.75 N en lugar del estándar de proteína.

Añada 1 ml. del reactivo de trabajo de Lowry a los tubos conteniendo los blancos, los controles negativos, las muestras, los estándares de endotoxina y los estándares de proteína. Mezcle bien. Incube por 10 minutos a temperatura ambiente.

Añada 0.1 ml. de Reactivo de Folín-fenol 1 N. Mez
cle inmediatamente (antes de 10 segundos). Espere
aproximadamente 10 segundos entre cada tubo para -
añadir el reactivo de Folín-fenol (esto permitirá
un periodo de incubación de 30 min., mucho más pre
ciso para cada tubo, antes de medir la absorbancia)

Incube por 30 min. a temperatura ambiente. El - -
tiempo de incubación es crítico porque el color em
pieza a debilitarse después de los 30 mins.

Mida la absorbancia a 660 nm con un espectrofotóme
tro equipado con una microcubeta (0.5 ml.) de paso
de flujo.

Ponga el espectrofotómetro en 0 usando el blanco de
proteína con NaOH preparado anteriormente.

Anote las absorbancias de los controles negativos,
de las muestras, de los estándares de endotoxina y
de los estándares de proteína. Anote las lecturas
directamente en la hoja de datos que se adjunta. -
Lea las absorbancias de los tubos en el orden en -
que se agregó el reactivo de Folín-fenol (agregar
el reactivo de Folín-fenol de preferencia de menor
a mayor concentración en cada una de las series es
tándar de endotoxina y de proteína).

5. REGISTRO Y ORGANIZACIONES DE DATOS:

Anote la descripción de cada solución probada y la clave y - número de lote correspondiente en la hoja de reporte, así co mo las absorbancias de cada muestra (hay tres espacios en la hoja de reporte, usar dos de los espacios para reportar los resultados de la bolsa y del frasco). Anote asimismo los va lores de absorbancia para la curva estándar de endotoxina, - la curva de HSA (albúmina sérica humana) y para los contro- les negativos. Una vez que todos los datos hayan sido anota dos, anote en el espacio correspondiente el promedio de las absorbancias por triplicado para los controles negativos. -- Circule el valor más bajo de las densidades ópticas por tri- plicado para la solución de endotoxina de 50 pg/mo. Este va lor se considera el "Límite". Calcule el promedio de los va lores de absorbancia por triplicado para la solución de endo- toxina de 50 pg/ml y anótelos en la casilla correspondiente. Para cada uno de los datos por triplicado lleve a cabo lo si guiente:

- A. Reste el valor más bajo de absorbancia del más alto y - anótelos en la casilla marcada como "a-b".
- B. Si la diferencia obtenida es de 0.2 o menor los datos - por triplicado de absorbancia son aceptables y se debe- rá rellenar la casilla con la letra "A". Si la diferen- cia es mayor de 0.2 se deberá llenar la casilla con la

letra "N" y la prueba se considerará inválida y deberá ser repetida.

Cheque las diferencias entre los controles negativos y los estándares de 50 pg/ml y 200 pg/ml para los siguientes:

- A. Reste el promedio de las absorbancias de las soluciones de 50 pg/ml del valor de absorbancia de la solución de 200 pg/ml. Anote el valor en la casilla correspondiente.
- B. Reste el promedio de absorbancia de los controles negativos del promedio de los valores para la solución de 50 pg/ml. Anote el resultado en la casilla correspondiente.
- C. Si cualquiera de los resultados encontrados en A o B -- son menores a 0.200, la prueba deberá ser repetida y se deberá rellenar el recuadro con la letra "N" (No aceptable).
- D. Si los valores de absorbancia de la muestra son menores al valor más bajo de la solución estándar de endotoxina de 50 pg/ml, ponga una palomita en el recuadro que dice "Pasa". Si el valor de la muestra es igual o mayor que el más bajo de la solución de endotoxina de 50 pg/ml -- ponga una palomita en el recuadro que dice "Reanálisis". Si después de hacer la reprueba el promedio de los valores de la muestra es menor que el más bajo de los valo-

res de la solución de endotoxina de 50 pg/ml entonces - ponga una palomita en el recuadro que dice "Pasa". Si los valores de absorbancia de la muestra de reprobación son iguales o mayores al más bajo de los valores de absorbancia de la solución de 50 pg/ml marque el recuadro "Falló".

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

Interpretación:

Los productos analizados pueden ser considerados no pirogénicos si se cumplen las siguientes condiciones:

- A. Si cada uno de los valores por triplicado para cada muestra (frasco y bolsa) tienen absorbancia menores al valor más bajo de los valores por triplicado para la solución estándar de endotoxina de 50 pg/ml.
- B. El promedio de los valores de absorbancia para los controles negativos es menor a 0.2.
- C. La diferencia entre los valores de absorbancia por triplicado para el estándar de endotoxina de 50 pg/ml y la diferencia entre los valores de absorbancia de los controles negativos no excede de 0.20.
- D. Deberá haber un mínimo de 0.2 unidades de absorbancia entre el promedio de absorbancia de los controles nega-

- tivos y el promedio de absorbancia de los estándares de endotoxina de 50 pg/ml.
- E. Deberá haber un mínimo de 0.2 unidades de absorbancia - entre el promedio del control de 50 pg/ml y el de 200 - pg/ml de endotoxina.
- F. Si los valores por triplicado de las muestras presentan absorbancia igual o arriba del valor más bajo del control de 50 pg/ml de endotoxina de E. coli (no promediar los valores de las muestras). Entonces el lote deberá ser reanalizado usando nuevamente tres tubos para probar la muestra a fin de descartar la posibilidad de contaminación por error en la técnica o en la preparación de la solución de endotoxina de 50 pg/ml. Prepare una curva estándar como se hizo en el análisis inicial. La diferencia entre los valores de absorbancia de la muestra por triplicado no deberá exceder 0.20. Promedio -- los valores de absorbancia de prueba de las muestras.
- G. Si el promedio de los valores de prueba de la muestra es mayor o igual al valor más bajo de los valores por triplicado de la solución con 50 pg/ml de endotoxina de E. coli, se deberá someter la misma muestra a prueba de pirógenos en conejo, usando ocho conejos.
- H. Si el promedio de los valores de prueba de la muestra son menores al valor más bajo de los valores por tripli

cado de la solución con 50 pg/ml de endotoxina, el producto puede ser liberado como "No pirogénico".

- I. La curva de Albúmina Sérica Humana (HSA) provee un estándar de trabajo para la detección de proteína en la prueba del LAL. Ella establece una diferenciación colorimétrica progresiva entre las diferentes concentraciones de HSA y debe ser consistente día a día. Un cambio abrupto en la apariencia de la curva de HSA representa un problema con los reactivos usados en la prueba de -- Lowry o bien en el espectrofotómetro. Si se detectaran fallas ya sea en las preparaciones de reactivos o en el equipo usado en la prueba de Lowry para determinación de proteínas, se deberán tomar las acciones correctivas pertinentes para determinar la causa y remediar la situación antes de proceder a repetir las pruebas.

Cuantificación de la Prueba:

(El siguiente procedimiento no es obligatorio, se comenta -- aquí con fines informativos)

Los valores de absorbancia obtenidos para las muestras probadas pueden ser convertidos a valores de equivalentes de endotoxinas expresados en picogramos por ml., de forma que las diferentes compañías farmacéuticas pueden monitorear tanto sus materias primas como sus productos terminados y de esta forma sea posible analizar valores a través del tiempo y eva

luar tendencias.

A decir verdad ésto no es un fenómeno muy usual, salvo que se quisiera hacer algún estudio específico, ya que la prueba de pirógenos es una prueba de "Pasa" o "No Pasa", es decir, uno no puede indicar que un producto esté poco o muy pirogénico, simplemente o está o no lo está. Y dado que la no pirogenicidad es una de las pruebas más importantes que deben cumplir algunos preparados farmacéuticos (ya que comprometen la seguridad del usuario) no es común que la Industria se -- cuantifique la cantidad de endotoxinas bacterianas, de cualquier manera en caso de que fuese necesario, para cuantificar la prueba del LAL es necesario incluir los siguientes pa sos:

Para cada tipo de solución (Formulación Química) a ser cuantificada se deberán prepara dos controles adicionales de endotoxina:

- A. 100 pg/ml - Diluya 1.0 ml de la solución semanal de endotoxina en una matraz volumétrico de 100 ml usando el disolvente apropiado. Mezcle bien.
- B. 25 pg/ml - Diluya 0.25 ml de la solución semanal de endotoxina en un matraz volumétrico de 100 ml usando el disolvente apropiado. Mezcle bien.

En adición a los tubos rutinarios para los controles de endo

toxina añada tres tubos para las soluciones de 25 y 100 pg/ml (tres para cada una), añada dos tubos adicionales para el control de endotoxina de 12 pg/ml. Promedie los valores de absorbancia de las soluciones por triplicado de 100, 50, 25 y 12 pg/ml, junto con los controles negativos (el promedio), se formará una curva de cuantificación de 5 puntos. NO use el valor de absorbancia para la solución de 200 pg/ml cuando construya una curva control de endotoxina para propósitos de cuantificación.

Convierta el promedio de absorbancia de cada muestra en equivalentes de endotoxina expresada en picogramos por mililitro usando una calculadora que cuente con un programa para hacer análisis de regresión lineal.

Si el valor equivalente de endotoxina para una muestra excede el valor de 100 pg/ml, el resultado está afuera del rango de prueba del sistema. Cuando esto ocurra, la muestra deberá ser reanalizada mediante diluciones en serie, usando la misma solución (en composición química) no pirogénica que se usó para preparar los controles negativos y la curva de endotoxina. La muestra será diluida hasta que sus valores de absorbancia sean menores que los de la solución de control de 100 pg/ml. Seleccione aquella dilución cuyo valor de absorbancia sea el más parecido al del control de 50 pg/ml. Calcule el valor equivalente de endotoxina de la muestra y multiplique el resultado por su factor de dilución para obtener

el valor real de endotoxina en la muestra. Por ejemplo, si el valor de absorbancia de la muestra de prueba que está más cerca del valor de absorbancia del control de 50 pg/ml se obtiene cuando la muestra es diluida en la proporción de 1:8, multiplique el valor computado de endotoxina por 8 para obtener de esa manera el valor real equivalente de endotoxina en picogramos por mililitro.

Preguntas:

Basado en los criterios establecidos en esta práctica, las soluciones que usted analizó, ¿pasan o no pasan la prueba -- del Lisado de Amebocitos de Limulus?

¿Por qué para preparar tanto la curva de endotoxina como para los controles negativos se usa una solución no pirogénica con la misma composición química que la solución a ser probada?

¿Cuál es el fundamento de la determinación de proteínas por el método de Lowry?

¿Cuál es la razón de que las muestras deban ser leídas durante la determinación de proteínas por el método de Lowry en el orden de menor a mayor concentración en el espectrofotómetro?

¿Si usted descubriera un lote de producto pirogénico suponiendo que usted trabajara ya en la industria, qué haría? Ex

plique sus razones para aprobar o rechazar el lote.

7. BIBLIOGRAFIA:

- Bang, F.B., A bacterial disease of Limulus Polyphemus, Bull. Johns Hopkins hosp., 98 p 325 (1956)
- Cooper, J.F., Levin, J., and Wagner, H.N., Quantitative comparison of In Vitro and in Vivo methods for the detection of Endotoxin; J. lab. Clin. Med.; 78; p. - 138 (1971)
- Cooper, J.F., Principles and Applications of the Limulus test for Pyrogen in natural drugs, Bull, Parent, Drug Assoc., 29, p. 122 (1975)
- Cooper, J.F. and Pearson, S.M.; Detection of endotoxin in biological products by the Limulus Test; International Symposium on Pirogenicity innocuity and toxicity - test systems for biological products, Budapest 1976, - Devl. Biol. Std., 34, p. 7 (S. Karger Basal, 1977)
- Cooper, James F., Pyrogen technology, P. & MC Industry, Sep-Oct, 1982 p. 43-44, 63-64
- Hui, Lim K and Thomas, W. H., Rheological parameters for Limulus ameobocyte lysate-endotoxin reaction, International Journal of Pharma ceutics, 10 (1982), - pages 133-141
- Levin J., and Bang, F.B., The rule of endotoxine in the extracelullular coagulation of Limulus Blood, Bull. Johns Hopkins Hosp., 115, p. 265 (1964)
- Levin J. and Bang F.B.; Clottable Protein in Limulus: Its localization and Kinetics of its Coagulation by endotoxin. Thromb. Diath Haemorrh., 19 p. 186 (1968).
- Loeb, L., On the blood cells and inflammatory processes of Limulus, J. med. Res., 7 p. 145 (1902).
- Melvaer, K. L. and Fystro, D., Modified micromethod of the Limulus Amoebocyte Lysate Assay for endotoxin, Applied & Environmental Microbiology, Feb. 1982, p. - 493-494.

- Mills, D.F. Pyrogen (Technical bulleting, Mallinckrodt, Inc. St. Louis, Mo.) Feb. 1978.
- Movitsky, T. J., Monitoring and Validation of High Purity Water Systems with the Limulus Amebocyte Lysate Test for Pyrogens, Pharm. Engr., march-April, 1984.
 - Pearson, F.C., Use of the Limulus Amebocyte Lysate -- Test in the Pharmaceutical Industry for detection of Endotoxin, Proceedings 1979;
Mfg. Eng. & OA section Meeting HIMA, Document No. 5 - Vol. 2, April 1980, page 45-47
 - Reich, R.R., The possible effect of ETO on the LAL -- Reaction, MD & DI, Dec 1984
 - Ross, V. C., LAL Testing of Medical devices: A regulatory Update, MD & DI, March 1984
 - Tsuji, K., Robotic Systems for automated Chromogenic LAL Endotoxin Assay, Pharm Mfg., Oct. 1984
 - USP XXI, United States Pharmacopeia.
 - Washtel, R.E., Comparison of Limulus Amebocyte Lysates and Correlation with the United States Pharmacopeia - pyrogen Test, Appl, Env. Microbiology, Vol 33 June - 1977
 - Weary, M. and Baker, B., Utilization of the Limulus - Amebocyte Lysate test for pyrogen testing large volume parenterals, administration sets, and medical devices., Bull. Parent. Drug. Assoc., 31, p. 127 (1977)
 - Weary, M., Pyrogen testing with Limulus Amebocyte Lysate, MD & DI, November 1980

D I S C U S I O N

En esta proposición de Manual de Prácticas de Microbiología Farmacéutica, se plantean en forma secuencial los diferentes análisis efectuados en la Industria Farmacéutica, empezando con el análisis microbiológico de la materia prima por tres diferentes métodos, continuando después con el análisis de agua y aire; en el caso del agua por tratarse del ingrediente principal de toda forma farmacéutica y en el del aire por que es un elemento presente en todos los procesos farmacéuticos y que, por estar en contacto con el producto, su pureza microbiológica debe ser controlada.

A continuación se incluyen dos prácticas de determinación de potencia en un antibiótico por diferentes métodos y finalmente tres prácticas relacionadas con inyectables; prueba de pirogenos por conejos, determinación de Endotoxinas por medio del Lisado de Amebocitos de Limulus y prueba de esterilidad. Existen otras pruebas que se realizan en la Industria Farmacéutica y que no están incluidas en este manual, las cuales no fueron incluidas por tratarse de pruebas muy específicas para ciertos productos o industrias. Las prácticas aquí - - planteadas son representativas y se aplican a casi toda la - Industria Farmacéutica.

La mayor parte de las mismas están basadas en métodos conocidos de la USP o bien desarrolladas, probadas y usadas en diferentes laboratorios quienes amablemente proporcionaron la información.

Se trató dentro de lo posible sugerir el uso del equipo común en todos los laboratorios, evitando al máximo la necesidad de equipo sofisticado que no pudiera ser obtenido para realizar la práctica.

En todas las introducciones de las prácticas se trató de dar una amplia explicación de las razones por las cuales es necesario realizar la prueba en los productos farmacéuticos, de manera de ofrecer una guía al profesor, estableciendo así la conexión entre la escuela y la Industria. Así mismo, en cada introducción se explicó el fundamento teórico de la práctica por la importancia que reviste la formación de profesionales y no sólo técnicos.

Se hizo especial énfasis en la organización de la parte de registro y organización de datos con la finalidad de que el alumno aprenda a poner por escrito los resultados de un trabajo realizado y que adquiere hábitos de orden, limpieza y disciplina, los cuales minimizan las posibilidades de error.

Finalmente, en la parte de preguntas se intentó buscar la integración del conocimiento entre lo captado por el alumno y lo que enseñó el maestro, asegurando en esa forma el cumplimiento del objetivo de las prácticas.

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

1. Este manual es una recopilación de las diferentes pruebas microbiológicas llevadas a cabo en la Industria - - Farmacéutica.
2. Este trabajo puede ser usado como base, haciéndole las modificaciones que se crean convenientes para adaptarlo al programa de estudios en la elaboración del programa de Prácticas de Microbiológica Farmacéutica.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

- 1) Abdou, M.A.F.; Determination of airborne microorganisms in a Pharmaceutical plant using standard, elective and selective culture media. Pharm. Tech. 4: 93-100 (Nov.) 1980
- 2) Akers, M.J., Attia, I.A., Avis, K.E., Understanding and utilizing Fovalues, Pharm. Tech. 2:31-35 (May) 1978.
- 3) Antibiotics: in historical perspective. Merck, Sharp & Dohme International. 1981.
- 4) Baggerman C., Kannegieter L. M., Microbiological contamination of raw materials for large-volume parenterals,
- 5) Bang, F.B., A bacterial disease of Limulus Polyphemus, Bull, Johns Hopkins hosp., 98 p. 325 (1956)
- 6) Barclay, D.L.; Developeping a clean room garment program. MD & DI June 1983
- 7) Berry, Ira R., Process validation of raw materials, -- Pharm. Tech., 5:38-39 Feb 1981
- 8) Bonalsky J. R., A model system for testing raw material for microbial content. Pharm. Tech., 4:49-51 (Feb) 1980
- 9) Borick, Paul M. and borick, Joan A., Sterility testing of Pharmaceuticals, Cosmetics and Medical devices, -- Ethicon, Inc. Somerville, N.J.
- 10) Bruch, C.W., Biological Indicators as degrees (Probabilities of sterilization) Chapter I; Developments in Industrial Microbiology; V 14 American Institute of Biological Sciences. Washington D.C. P. 3-16 19.

- 11) Bruch C. W., Objectionable Microorganisms in non sterile drugs & cosmetics, D & CI. October 1972
- 12) Buhlmann X., Microbiological quality of pharmaceutical preparations, American Journal of Pharmacy, Nov-Dec - 1972
- 13) Buogo, A.; Tentative Method for the qualitative detection and quantitative assessment of air contamination by drugs. Applied Microbiology June 1972
- 14) Caputo, R.A.; The design and Use of Biological indicators for Sterilization - cycle Validation; MD & DI, 2 : 23-27, Aug 1980.
- 15) Carlberg, D. M.; The microbiological assessment of -- Bioclean-room Quality. Pharm. Mfg Nov 1984
- 16) Chatterjee A., Radiometric detection of pseudomonas -- aeruginosa in pharmaceutical products, Pharm. Tech. -- 4:45-48 (Abr) 1980
- 17) Chinn, A.; Gamma Sterilization and Single-Use Devices; Part I, II, MD & DI, Jan 1980 p. 21-23
- 18) Code of Federal Regulations 21, Parts 141 to 169, paragraph 141.110 Revised as of April 1st, 1973; U.S. Government Printing Office, Washington D.C.
- 19) Code of Federal Regulations 21, parts 300 to 499 paragraph 436.106 Revised of April 1st, 1975 U.S. Government Printing Office, Washington D.C.
- 20) Cooper, J.F., Levin, J., and Wagner, H.N., Quantitative comparison of In Vitro and in Vivo methods for the detection of Endotoxin; J. lab. Clin. Med.; 78; p. 138 - (1971)

- 21) Cooper, J.F., Principles and Applications of the Limulus test for Pyrogen in natural drugs, Bull. Parent. -- Drug Assoc., 29, p. 122 (1975)
- 22) Cooper, J.F. and Pearson, S.M.; Detection of endotoxin in biological products by the Limulus Test; International Symposium on Pirogenicity innocuity and toxicity - test systems for biological products, Budapest 1976, - Devl. Biol. Std., 34, p. 7 (S. Karger Basal, 1977)
- 23) Cooper James F., Pyrogen technology, P. & MC Industry, Sep-Oct, 1982 p. 43-44, 63-64
- 24) Cosgrove, R.F.; Novel Approach to Analysis of Antibiotics. Anal Proc. 21:8, 295-297, 1984
- 25) Crabe, D.; A Double pass reverse osmosis system, Industrial Water Engineering, Dec 1976
- 26) Davis, Bernard et al; Microbiology 2dn ed.; Harper & Row Publishers, Inc. 1973 pg. 638-639, 765
- 27) Dell, L.A.; Aspects of microbiological monitoring for non-sterile and sterile manufacturing environments. - Pharm. Tech. 3: 47-51 Aug 1979
- 28) Delmore, R.P. and W.N. Thompson; A comparison of air-sampler efficiencies; MD & DI Feb 1981 p. 45-48
- 29) Desessa, P.A.; The Generation of Pharmaceutical Grade Water by Distillation. Pharm. Tech. 4:103-112 (Nov) -- 1980
- 30) De Vecchi, T.A., Training personnel to work in sterile environments; Pharm. Tech. 2: 41-44 Aug. 1978

- 31) De Visser, A.D. Microbiological aspects of an environmental program p. 70-81; Pharmaceutical manufacturers - association. Proceedings of the second PMA seminar - program on validation of sterile manufacturing processes: Aseptic Processing. Atlanta Georgia, March 1979
- 32) Dixon J. R., Quality assurance and quality control of - commercially prepared microbiological power media, -- Pharm. Tech., 1: 27-30 (Sup) 1977
- 33) Eisman, P.C.; The Bacteriological aspects of deionized water, J. Am Pharm. Assn.
- 34) Florey, J.G.; Pharmaceutical Analysis. Amer. Pharm 21, No. 8 Aug 1981 p. 30-35
- 35) Fried, E.; Environmental controls- A systems engineer - ring approach. MD & DI 1:1; June 1979; p. 45-49
- 36) Gay M., Testing the efficacy of antimicrobial preservation: pharmacopeial requirements, practical experience, and drug safety, Pharm. Tech., May 1983
- 37) General Services Administration. Federal clean-room and workstation requirements, controlled environment. April 24, 1973 p. 1-35
- 38) Giorgio, R.J. Considerations in the design of hot circulating water for injection systems. Pharm. Tech. 2: - 19-24 (Dec) 1978
- 39) GNP Report. Plant Sanitation Program, Vol 2 No. 2 1981
- 40) Gordon, M.R.; Process Water, Cosmetics & Toiletries, -- Vol 98 April 1983
- 41) Gunther, D.A., The Chemistry and Biology of ETO Sterilization; MD & DI, 2: 12, Dec 1980 p. 35-35.

- 42) Hepa filters (Recommended practice) Institute of Environmental Sciences Nov 1983
- 43) Heyl, H.; Deionized Water in Pharmaceutical Plants: An essential requirement. Pharmaceutical Engineering, -- March/April 1983
- 44) Hill, R. W., Water in the pharmaceuticals and cosmetics industries, Manufacturing Chemist & aerosol news, May - 1981, p. 41-43
- 45) Hopes T. M., Quality control of raw materials, D & C I, April 1972, p. 46-49, 134-138
- 46) Hui, Lim K and Thomas, W. H., Rheological parameters -- for Limulus amoebocyte lysate-endotoxin reaction, International Journal of Pharmaceutics, 10 (1982), pages - 133-141
- 47) Jarzebinski, J. et al; Densitometric determination of - active components in pharmaceuticals. Acta Pol. Pharm - Vol 43, 3, p. 260-263, 1986
- 48) Juran/Gryna "Quality planning and analysis", 2nd Ed., - p. 59-67, Mac Graw Hill Book Company, 1980
- 49) Kerns, W.T.; A practical Approach to D value and 2 value Determination; Pharm. Eng.; Feb-Apr. 1981 p. 46, - 48, 50.
- 50) Kleiman, L., Wertman, L. and Shlisky, T; LVP Sterilization and the proposed GMPs; Pharm. tech., 4: 99_101 -- (Jun) 1980.
- 51) Klink, A.E., Artiss, D.H. Good Manufacturing practices for Water; Classes, Methods of manufacture, Testing --

- requirements and intended uses. J. Parenter. Drug Assn; 32:5 (Sep-Oct) 1978 p. 226-235.
- 52) Kuhlman, H.C., Technical processes in the production of water for injection; J. Parenteral Science and Technology, Vol 35, No. 2, March-April 1981 p. 54-59
- 53) Lachman et al, The theory and practice of industrial - pharmacy, 3rd ed., Lea & Febiger, 1986 Philadelphia.
- 54) Laminar Flow Clean Air devices; Recommended Practice; - Institute of Environmental Sciences Nov 1983
- 55) La Rocca, P.T.; Testing requirements for HEPA filters - and clean work stations. Pharm. Mfg.; March 1985
- 56) Levin J., and Bang, F.B., The rule of endotoxine in the extracellular coagulation of limulus Blood, Bull. -- Johns Hopkins Hosp., 115, p. 265 (1964)
- 57) Levir J. and Bang F.B.; Clottable Protein in Limulus: Its localization and Kinetics of its Coagulation by endotoxin. Thromb. Diath Haemorrh., 19 p. 186 (1968)
- 58) Loeb, L., On the blood cells and inflammatory processes of Limulus, J. med. Res., 7 p. 145 (1902)
- 59) Loshbaugh, C.; Microbiological considerations for ETO - sterilization; MD & DI; Jan 1980 p. 25-30
- 60) Malcolm S. A., Microbiological monitoring and quality - control, Manufacturing chemist & aerosol news, Nov 1980 p. 55-56.
- 61) Mascoli, C.C.; Should End-product Sterility Testing -- Continue?; MD & DI Apr 1981, p. 8-9

- 62) Mead W. J., Control of raw materials, Cosmetics & Toiletries, Vol 94, January 1979, p. 43-45
- 63) Melvaer, K. L. and Fystro, D., Modified micromethod of the Limulus Amoebocyte Lysate Assay for endotoxin, -- Applied & Environmental Microbiology, Feb. 1982, p. 493-494.
- 64) Mills, D.F. Pyrogen (Technical bulleting, Mallinckrodt, Inc. St. Louis, Mo.) Feb. 1978
- 65) Morhard, W.H.; Designing for the environmental control of pharmaceutical manufacturing facilities. Pharm. -- Engineering Nov-Dec 1983
- 66) Murty, R., Kapoor, J., Franklin, G.; In-process controls during the manufacture of injectables; Pharm. tech.; -- 1: 77-80 (Nov) 1977.
- 67) Murty R., Kapoor J., Purity standards for ingredients used in parenteral preparations, Pharm. Tech. 4:60-63 - (Feb) 1980
- 68) Myers, R.B.; Practical system for validating heat sterilization processes; Journal of the Parenteral Drug Assn, September-October 1978 Vol 32, No. 5; p. 216-231.
- 69) Nebel, Carl & Theresa; Ozone, the process water sterilant; Pharm, Mfg. April 1984 p. 15-23
- 70) Novitsky, T. J., Monitoring and Validation of High Purity Water Systems with the Limulus Amebocyte Lysate Test for Pyrogens, Pharm. Engr., march-April, 1984.
- 71) Outschoorn, A.S., Developments in compendial standards for sterility tests and their relation to sterility - assurance in manufacturing control Pharm. tech. Conference 1982

- 72) Palmieri M. J., FDA methodology for the microbiological analysis of cosmetics and topical drugs. J. Soc. Cosmet. Chem., 34, Jan-Feb 1983
- 73) Panel discussion: Environmental sampling in an aseptic environment; Bull. Parenter. Drug Assn. 28:6 (Nov-Dec) 1974 p. 253-269
- 74) Parascandola, J.; Dawn of the antibiotic era. Pharm. -- Tech. 4:60, p. 65-66 Nov 1980
- 75) Parenteral Drug. Assn. Validation of aseptic filling, - for solution drug products. Parenteral Drug. Assn. -- Technical monograph No 2 1980 27 p.
- 76) Pearson, F.C., Use of the Limulus Amebocyte Lysate Test in the Pharmaceutical Industry for detection of Endotoxin, Proceedings 1979: Mfg. Eng. & QA section Meeting - HIMA, Document No. 5, Vol 2, April 1980, page 45-47
- 77) Pflug, I. J.; Sterilization: Science, not art; MD & DI; Mar 1981 p. 8-9
- 78) PMA position paper. Alternatives to performing finished product sterility testing of large volume parenteral -- solutions. 1980, 5 pages.
- 79) PMA, Proceedings of the PMA Water Seminar Program Jan-- Feb 1982
- 80) Price J.M., Establishing microbiological specifications for pharmaceuticals not required to be sterile, Pharm. Mfg., April 1984 p. 26-29
- 81) Rechen, R.C.; Water for Injection in device Manufacture; MD & DI, May 1981 p. 37-41, 70-72

- 82) Rechen, H.C.; Miller, R.T.; Design Considerations for a Pharmaceutical- grade RO.-DI water purification system; P & M C Industry; Sep-Oct 1983
- 83) Rechen, H.C., The Role of ultrafiltration in the production of pyrogen-free purified water; Pharm Mfg; Sep -- 1984.
- 84) Reich, R.R., The possible effect of ETO on the LAL Reaction, MD & DI, Dec 1984.
- 85) Riggs T.H., Supplier insurance, how much do you need?, MD & DI, 1:3 August 1979 p. 14-15
- 86) Riggs, T.H.; Sterilization, Goals versus the state of the art. MD & DI; Nov 1979, p. 18-19.
- 87) Ross, V. C., LAL Testing of Medical devices: A regulatory Update, MD & DI, March 1984
- 88) Schlesinger R., Prequalification of raw materials-an R & D challenge, MD & DI Sep 1979 p. 17-25
- 89) Scruton, S.H.; Up-grading water purity for manufacturing nonsterile pharmaceutical products. Pharm. Tech. -- 4: 39-42 (Jul) 1980 Sterile pharmaceutical products. --
- 90) Seeger, G.A.; Clean-room standards- Good manufacturing practices and Federal standard 209-B - A comparison.
- 91) Simpson, D.L., Kobos, R.K.; Potentiometric microbiological assay of gentamicin, Streptomycin and Neomycin with a Carbon Dioxide gas-sensing electrode. Anal. Chem. -- 55:12 p. 1974-1977
- 92) Simpson, D.L.; Kobos, R.K.; Microbiological Assay of -- antibiotics based on inhibition of ammonia production -- monitored with an ammonia electrode; Anal. Chim. Acta;

164: 273-277, 1984

- 93) Sorensen, R. L.; F.S. 209-B: A part of total environmental Control Pharm. Eng.; Nov-Dec 1984
- 94) Spooner D., Microbiology training and Pharmaceutical - production, Bull. Parenter. Drug Assn., 27:6 (Nov-Dec) 1973 p. 257-265
- 95) Stadnisky, W.; Reverse Osmosis-Technology and Systems for Water purification. Pharm. Engr.; March-April 1984 p. 34-37
- 96) The Cosmetic, Toiletry and Perfumery Assn.; Recommended microbiological limits & guidelines to microbiological Quality Control; July 1983
- 97) The Pharmacological Basis of therapeutics. L. Goodman & A. Gilman The Mac Millan Company, New York 2nd ed.
- 98) Tsuji, K., Robotic Systems for automated Chromogenic - LAL Endotoxin Assay, Pharm Mfg., Oct 1984
- 99) Uotila, J.A.; Santasalo, N.T.; New concepts in the manufacturing and sterilization of LVP's in plastic -- bottles. J. Parenteral science & Technology; vol 35, No. 4, July-Aug 1981 page 170-175
- 100) USP XXI, United States Pharmacopeia 1985
- 101) Vanderwielen, Adrianus J.; Guidelines for assay validation, Pharmaceutical Technology, March 1982 p. 66-76
- 102) Vlasak, F.J. Production, Storage and Quality of Processed Water, PMA International Technical Committee -- meeting; September 1981, page 1-10

- 103) Wachtel, R.E., Comparison of Limulus Amebocyte Lysates and Correlation with the United States Pharmacopeial - Pyrogen Test, Appl. Env. Microbiology, Vol 33 June - 1977
- 107) Weary, M. and Baker, B., Utilization of the Limulus -- Amebocyte Lysate test for pyrogen testing large volume parenterals, administration sets, and medical devices., Bull, Parent. Drug. Assoc., 31, p. 127 (1977)
- 105) Weary, M., Pyrogen testing with Limulus Amebocyte Ly-- sate, MD & DI, November 1980