

28
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DETECCION DE FUENTES PIROGENICAS EN LA
FABRICACION DE INYECTABLES Y SERVICIOS
AUXILIARES, POR LA PRUEBA
DE LIMULUS**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A N :
MARIA LOYDA CASTRO CORDOBA
EFRAIN JACOB LOPEZ PEREZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO:

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCION	I
CAPITULO I.	
1.1.- GENERALIDADES.PIROGENOS	3
1.2.- DEFINICION	4
1.3.- CLASIFICACION	4
1.4.- CLASIFICACION DE LOS INYECTABLES	6
1.5.- DESPIROGENIZACION	7
CAPITULO II.	
2.1.- LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS	11
2.2.- TECNICA. PRUEBA DE LIMULUS	14
2.3.- CONDICIONES ESPECIFICAS	15
2.4.- RELACION CON LA PRUEBA FARMACOPEICA	16
2.5.- APLICACIONES ESPECIFICAS	17
CAPITULO III.	
3.1.- CRITERIOS BUENAS PRACTICAS MANUFACTURA	18
3.2.- EL HOMBRE COMO FUENTE DE CONTAMINACION	20
3.3.- EL AMBIENTE COMO CAUSA DE CONTAMINACION	24
3.4.- LOS INGREDIENTES COMO CAUSA DE CONTAMINACION	26
3.5.- TRATAMIENTOS PARA PURIFICAR EL AGUA	29
3.6.- LINEAMIENTOS DE VALIDACION PARA EL ABASTECIMIENTO DE AGUA DE ALTA PUREZA	30
3.7.- LOS PROCESOS DE MANUFACTURA COMO CAUSAS DE CONTAMINACION	33
3.8.- CONTROLES EN PROCESO Y TECNICAS DE EVALUACION	36

CAPITULO IV

4.1.- PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

4.1. 1.- Introducción. Protocolo.	42
4.1. 2.- Caracterización. Endotoxina.	48
4.1. 3.- Selección del Reactivo	49
4.1. 4.- Guía Práctica de Procedimiento	49
4.1. 5.- Precisión del Analista	55
4.1. 6.- Relación L.A.L. y la Prueba Farmacopeica	56
4.1. 7.- Análisis In-Vivo/In-Vitro de una Endotoxina de Control.	61
4.1. 8.- Estudio Red de Agua	64
4.1. 9.- Cuantificación de Endotoxina en Agua para Uso de Fabricación	71
4.1.10.- Detección de Endotoxina en Materia Prima	73
4.1.11.- Detección de Endotoxina a Producto en Proceso	78
4.1.12.- Detección de Endotoxina en la Red de Vapor Limpio	80
4.1.13.- Detección de Endotoxina en Contenedores Primarios	82
4.1.14.- Detección de Endotoxina en Aire comprimido	87

CAPITULO V

5.1.- RESUMEN	89
---------------	----

CAPITULO VI

6.1.- CONCLUSIONES	91
--------------------	----

CAPITULO VII

7.1.- BIBLIOGRAFIA	93
--------------------	----

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

En la Industria Farmacéutica es necesario controlar las distintas fuentes de contaminación bacteriana ya que es de primordial importancia el asegurar que los productos para administración parenteral estén libres de pirógenos, de acuerdo a las especificaciones de cada caso en particular.

En virtud de que estos productos potencialmente pueden ser pirogénicos si durante su proceso no se siguen los controles necesarios, se hace caso omiso de las Buenas Prácticas de Manufactura o bien, durante el mismo son expuestos a una fuente de contaminación bacteriana .

Debido a estos riesgos los productos farmacéuticos para administración parenteral se someten a una serie de pruebas para asegurar su apirogenicidad, ya que éstos van a ser administrados directamente al torrente circulatorio del paciente y cualquier efecto adverso sería peligroso para la vida del mismo ya que podría provocarle desde fiebre hasta un shock que lo encaminaría a la muerte.

Por esta razón, elaborar productos farmacéuticos conlleva gran responsabilidad y nunca será suficiente el esfuerzo que se haga para mejorar la calidad y servir mejor a la salud. En este trabajo experimental nos proponemos estudiar la calidad microbiológica de un proceso de fabricación de un inyectable en solución, de pequeño volumen, a través de sus Controles en Proceso y auxi-

liándonos del parámetro pirogenicidad como elemento de medición en el seguimiento. Esperamos finalizar proponiendo bases prácticas para la aplicación de la Prueba de Pirógenos In-Vitro conocida como Lisado de Amebocitos de Limulus (L.A.L.); al usarse - como una Prueba de Control en Proceso para detectar fuentes pirogénicas y eliminarse antes de que su efecto disminuya la calidad del inyectable en etapa de manufactura. Dando como resultado mayor calidad, seguridad y ahorro de costos. Así como contribuir a preservar la salud de la población y desarrollar una herramienta útil a los profesionales farmacéuticos.

CAPITULO I

1.1.- GENERALIDADES SOBRE PIROGENOS.

Un problema conocido desde que se inició la terapia endovenosa es la reacción febril que se manifiesta poco después de la inyección. Este tipo de respuesta puede presentarse al inyectar con prudencia cualquier solución (salvo de sustancias que por sí sean pirogénicas) por vía endovenosa o intramuscular, incluso la sangre nos produce trastornos de tipo hemolítico o anafiláctico, y es debido a la presencia de pirógenos bacterianos, -fúngicos y posiblemente virales, acarreados en la solución.

Los pirógenos de los gérmenes gram negativos, a la fecha -parecen ser los más activos manifestándose por hipertemia en el conejo y en el hombre.

Los pirógenos provocan otros efectos farmacológicos aparte de los ya señalados, siendo los más importantes una modificación en el conteo de los glóbulos blancos, alteración en la coagulación y, en grandes dosis, pueden producir shock y muerte.

En la bibliografía se suelen usar indistintamente los términos "pirógenos bacterianos" "endotoxinas". Sin embargo, las -endotoxinas son específicamente lipopolisacáridos de alto peso molecular que provienen de las membranas de los gérmenes gram -negativos. No son los únicos agentes pirogenéticos producidos -por microorganismos ya que gérmenes gram-positivos, hongos y virus también los producen, pero no poseen las mismas propiedades bioquímicas. El término pirógeno bacteriano incluye a todos los

agentes pirogénicos de origen microbiológico, incluidas las - endotoxinas.

En 1923 Siebert llamó sustancias pirogénicas a las responsables de las reacciones febriles.

1.2.- DEFINICION DE PIROGENOS.

Los pirógenos son producto del metabolismo de microorganismos gram-negativos en su mayoría, siendo de naturaleza lipopolisacárida que al ser introducidos al torrente circulatorio por vía parenteral provocan una respuesta febril.(1)

1.3.- CLASIFICACION DE PIROGENOS.

Existen dos clases de pirógenos que son: los de origen exógeno (exotoxinas bacterianas) y los de origen endógeno, los cuales a su vez se subdividen en pirógenos bacterianos y leucocitarios.

Los pirógenos endógenos de origen bacteriano son aquellas sustancias constituidas en su gran mayoría de las membranas celulares de las bacterias gram-negativas que pasan a la circulación del huésped creando un cuadro infeccioso.

Los pirógenos endógenos leucocitarios son liberados de las células sanguíneas (leucocitos) después de que el microorganismo es fagocitado por las células del sistema retículo/endotelial del huésped. (2)

El pirógeno exógeno es un grupo formado por las exotoxinas bacterianas que son venenos químicos secretados por las bacterias patógenas, principalmente las gram-positivas. Las gram negativas rara vez producen exotoxinas. Una exotosina se puede transformar en toxoide, de gran importancia en la producción de vacunas.

El pirógeno exógeno es fagocitado por las células (macrófagos, linfocitos, polimorfonucleares) presentándose un precursor para que se forme en una o dos horas y exista la producción del pirógeno endógeno de acuerdo a los mecanismos estudiados. Después este pirógeno endógeno va hacia el hipotálamo y produce la fiebre.

Como ya se mencionó con anterioridad, cuando se administra una solución pirogénica a grandes dosis pueden producir shock y muerte. Durante el período de latencia, los granulocitos desaparecen virtualmente del torrente circulatorio por adherencia a las membranas de los vasos sanguíneos, este hecho fue lo que hizo pensar que la endotoxina o pirógeno no actúa en forma directa sobre el hipotálamo sino a través de un agente endógeno producido por el granulocito por efecto de aquél. La producción del pirógeno endógeno se debe a un proceso metabólico y puede ser bloqueado por algunos inhibidores de enzimas. Todo ello tiene relación con el sistema inmune. (3).

En muchas de las reacciones pirogénicas entran en juego reacciones como: fagocitosis, formación de sustancias como son las linfocinas y todas éstas van a ayudar para que se forme el pirógeno endógeno.

Las sustancias pirogénicas que pueden producir estas reacciones en el caso por ejemplo de bacterias gram negativas, son los lipopolisacáridos y la reacción pirogénica se puede deber a un efecto tóxico o por un efecto fagocitario.

Este mecanismo es bastante complejo, el sistema inmune influye en gran forma; la toxicidad en algunos casos puede ser alguna reacción antigénica y en otros, se puede presentar una reacción por mediadores de formación de complemento.

Todavía existen muchas dudas acerca de este mecanismo de liberación del pirógeno endógeno. Se dice, por ejemplo: si existe un precursor enzimático en la célula ó es sintetizado por una señal, o es un proceso de inducción genéticamente controlado?. Las células que intervienen son de la serie monocítica y gramlocítica. Los neutrófilos y los monocitos son capaces de generar pirógenos endógenos mientras que los linfocitos no, sin embargo es posible que los linfocitos puedan producir factores solubles como son las linfocinas, fenómeno aún por comprobar.

1.4.- CLASIFICACION DE LOS INYECTABLES.

En 1965 Charlton clasifica los productos inyectables en dos grupos de acuerdo con el riesgo de pirogenicidad que puedan tener estos: de gran riesgo y de poco riesgo. De gran riesgo, soluciones de gran volumen; desde luego esto es lógico puesto que van directamente al torrente sanguíneo y en gran volumen. Los productos que por su naturaleza resultan ser un buen medio de cultivo, es decir aquellos productos que son extraídos desde materiales muy ricos en proteínas como son los hemoderivados o extractos de glándulas (como extracto de hígado) y aquellos que son pirogénicos per-se. En este caso se encuentran las vacunas que son per-se pirogénicas y que en un momento dado pueden ser de gran riesgo cuando se aplican.

De poco riesgo son aquellos productos que se administran en pequeños volúmenes y productos que son inhibidores o contienen inhibidores, desde luego porque aquí van actuar sobre los microorganismos y es más difícil que se presenten y que proliferen éstos.

1.5.- DESPIROGENIZACION.

Se puede lograr de dos formas: por inactivación o por remoción de endotoxina.

Los métodos de despirogenización varían en su eficiencia y deben ser diseñados específicamente para cada situación. Algunos son más aconsejables para superficies sólidas que para soluciones, otros son efectivos únicamente en materiales que pueden tolerar o conformarse a las condiciones requeridas por el método.

DESPIROGENIZACION POR INACTIVACION DE LA ENDOTOXINA

HIDROLISIS ACIDO-BASE.

La despirogenización utilizando hidrólisis ácida o básica reduce o elimina la actividad biológica de lipopolisacáridos bacterianos por desactivación del Lípido A. Se ha usado Solución de Acido Acético Glacial al 1% por 2 o 3 Hrs. a 100°C., Solución de Acido Clorhídrico 0.05 N. por 30 min. a 100°C., Solución de Hidróxido de Sodio 0.1 N. en Etanol al 95% o en Dimetil sulfóxido al 80%, lográndose buenos resultados. (4)

OXIDACION.

Este método usa agentes como Peróxido de Hidrógeno, Oxígeno molecular, Hipoclorito de Sodio, Acido Peryódico, Peryodato de sodio, Permanganato de Potasio diluido, Acido Nítrico, Dicromato y Dióxido de Selenio. Su mecanismo de inactivación es poco conocido, se reporta como una peroxidación de los ácidos grasos presentes en el Lípido A del lipopolisacárido. La inactivación por Peróxido de Hidrógeno depende del tiempo, pH y su concentración. Ofrece algunas ventajas sobre otros métodos por manejar bajas concentraciones (0.1 M. por 2 Hrs. ó 0.04 M. a 116°C. por 20 min. ó 1%: 2 Hrs.) y ser fácilmente eliminado en solución. (5)

ALQUILACION.

Un estudio publicado por Tsuji y Harrison demostraron que la endotoxina E. coli 0127:B8 redujo su actividad en un 94% después de que fue esterilizada por Oxido de Etileno 12% y Freon 88%, 50% de Humedad Relativa, 3.5 psig. por 6.5 Hrs. (6) Este método es aplicable a sustancias termolábiles y accesorios quirúrgicos; comunmente se usa Oxido de Etileno, Anhídrido Acético, Anhídrido Ftálico, etc.

CALOR SECO.

La aplicación de calor seco convencional (hornos por conducción o radiación) ha sido el método de elección para despirogenizar materiales resistentes al calor.⁽⁷⁾ El mecanismo de inactivación de las endotoxinas es incineración. Los estándares indican condiciones de exposición como no menos de 250°C. por no menos de 30 min., no obstante son valores relativos y dependerán circunstancialmente del volumen de carga del horno. Se recomienda no usar temperaturas menores de 175°C.

CALOR HUMEDO.

Estudiando la estabilidad térmica de las endotoxinas se encontró que el calor húmedo no es efectivo para despirogenizar, en condiciones normales (121°C., 15 psi., pH neutro, por 20 min.). No obstante la acción de ciertos agentes despirogenizantes (peróxido de Hidrógeno, Carbón activado, etc.) mejoran su efectividad cuando las soluciones a depirogenizar son autoclaveadas.

RADIACION.

El Cobalto (Co.60) reduce la toxicidad de las endotoxi-

nas bacterianas. (8) No obstante el desconocimiento de los cambios químicos que se producen en las soluciones parenterales durante la radiación, hacen que su uso se vea poco favorecido.

DESPIROGENIZACION POR REMOCION DE ENDOTOXINAS.

ENJUAGUE.

El método más antiguo y simple para remover endotoxinas de superficies sólidas es enjuagando con un solvente no-pirógeno, generalmente Agua Estéril U.S.P. para Inyección. Método efectivo cuando se aplica a materiales con bajos niveles de contaminación. (9)

DESTILACION.

Método más antiguo y efectivo para remover pirógenos -- del Agua. Su mecanismo es relativamente simple: El agua cambia de fase dos veces, de líquido a vapor y de vapor a líquido. Durante la primera fase, el calentamiento rápido en el -- destilador origina que agua evapore y el sistema agua-vapor lo active. Como los pirógenos se asemejan a una molécula -- grande, no pueden acelerarse tan rápidamente como el agua-vapor, son hechados a un lado por inercia. Estas moléculas (pi-- rógenos) permanecen en las gotas de agua acarreadas por el -- vapor y acción de la gravedad logran un alto peso molecular.

CARBON ACTIVADO.

Tiene una gran afinidad por substancias no iónicas y de alto peso molecular. La despirogenización de soluciones se -- basa en la adsorción física de la endotoxina al Carbón acti-- vado. El carbón es removido por filtración o precipitación.

OSMOSIS INVERSA.

Es uno de los dos métodos reconocidos por la U.S.P. para la producción de Agua estéril para Soluciones Acuosas Inyectables.

Remueve endotoxinas por exclusión (9). Las membranas convencionales para Osmosis Inversa (nominalmente con un tamaño de poro cercano a 10 Amstrong) son de acetato de celulosa o poliamida con poros lo suficientemente pequeños para excluir iones. Retienen grandes cantidades de sales bajo cierta presión de filtración.

ULTRAFILTRACION.

Es un método para remover virógenos de soluciones o materias primas de bajo a mediano peso molecular (9).

Las membranas para ultrafiltración son seleccionadas sobre las bases de límites de exclusión de pesos moleculares y su efectividad como filtro despirogenizante estriba en su acción selectiva; esto es, las endotoxinas que exceden el peso molecular límite de exclusión son retenidas en la superficie de la membrana. El tamaño de una subunidad básica de lipolisacárido es de --- 10,000 a 20,000. Normalmente los agregados de moléculas de LPS pesan de 300,000 a 1 millón. Un monómero no agregado raramente se encuentra en soluciones acuosas. Considerables cantidades de endotoxina en solución acuosa pueden removerse con un ultrafiltro seleccionado a un peso molecular de 100,000 o más.

CAPITULO II

2.1.- LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS.

A pesar de todos los avances en el conocimiento sobre la naturaleza química y fisiológica de los pirógenos, la prueba permaneció por más de cuarenta años sin cambio.

En Estados Unidos la Prueba de Pirógenos fue introducida en la Farmacopea en 1942; consistiendo en esencia observar la respuesta febril en conejos al ser inyectados por vía endovenosa, con una cantidad previamente especificada del producto. Sin olvidar que, como sucede con la Prueba de Esterilidad, la Prueba de Pirógenos nunca ha intentado garantizarse por un resultado negativo; más bien se trata de una comprobación final bajo la premisa de que nuestro producto ha sido debidamente controlado durante todo el proceso de elaboración.

No obstante la atención hacia esta Prueba se ve desviada cuando se descubre una reacción de gelificación "in vitro" entre endotoxinas y el lisado de amebocitos de Limulus.

La Prueba LAL (Lisado de amebocitos de Limulus) ha sido reconocida como la más sensible, con el método más conveniente para detectar endotoxinas bacterianas comúnmente conocidas como pirógenos, existiendo en estado libre o en forma asociada con la pared celular de bacterias gram-negativas. Se basa en la propiedad de gelificación, mecanismo característico del cangrejo Limulus Polyphemus, encontrado en aguas litorales de Estados Unidos de Norteamérica, específicamente a lo largo de la costa oeste. Los cangrejos herradura son fósiles vivientes de aproximadamente 300 millones de años y tienen como parientes más cercanos a la familia de las arañas. Los grandes ejemplares se establecen en las costas del Atlántico, siendo las hembras mucho más largas que los machos. Las especies que se utilizan para este fin, fueron recolecta

das a una profundidad de 30 o 40 pies cerca de Chiconteague, Virginia. Accidentalmente se encontraron dos pequeñas especies de *Limulus* en el sureste de Asia; por lo cual, los japoneses también producen el lisado.

El cangrejo herradura posee un sistema primitivo de gelificación sanguínea como mecanismo de defensa contra bacterias de bacillus gram negativos. Sus células sanguíneas, o amebocitos, se agregan para formar una malla, encima de la cual se forma un gel proteínico cuando el cangrejo está herido y sujeto a invasión de endotoxinas o bacterias (10).

En 1956, Frederick Bang encontró que cuando el sistema de gelificación fallaba moría el cangrejo por coagulación intravasular después de una infección bacteriana.

En 1954, Levin y Bang demostraron específicamente que la gelificación se debía a que la endotoxina activaba el sistema enzimático mediante la conversión de la proteína coagulable del amebocito a gel. El punto de gelificación (medido por densidad óptica) fue relacionada a la concentración de proteína pre-coagulante.

Exámenes posteriores del gel reflejaron una matriz de fibras muy finas de 50-100 micras de diámetro.

La especificidad por la endotoxina a concentraciones relevantes para la pirogenicidad, como activador de la enzima pro-coagulante de los amebocitos, fue descubierta por Yin y otros investigadores (11).

El análisis del lisado indica que se precisan cuatro -- sustancias para que se lleve a cabo la reacción de coagulación del lisado; tres de ellas, la enzima procoagulante que es una fracción de peso molecular alto, sensible al calor; -- las proteínas coagulables (coagulógenos) es una fracción estable al calor de bajo peso molecular y los cationes divalen

tes (Ca^{+2}). Iniciándose en presencia de endotoxina (lipopolisacárido) de bacterias gram negativas.

El mecanismo de la reacción implica la activación de la enzima precoagulante por Ca^{+2} y endotoxina. Esta enzima activada cataliza el desdoblamiento del coagulógeno en subunidades de polipéptidos. La naturaleza química del coagulógeno y sus subunidades coagulantes fueron estudiadas en el *Limulus Polyphemus* y el *Tachypieus Tridentatus* (una especie parecida al cangrejo cacerola que fue encontrada en el mar de Japón y que tiene la misma reacción que el *Limulus* a las endotoxinas). En estos estudios, las subunidades de coagulógeno se denominaron cadenas A, B, C, de las cuales las cadenas A y B están unidas por enlaces bisulfuro formando el coágulo. La cadena C liberada de la porción interior de la molécula madre, no está incorporada al coágulo.

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

El mecanismo por el cual se produce la división del coagulógeno por la enzima precoagulante se cree que es similar al de la tripsina, hidrolasa de la serina. El disopropil -- fluorofosfato y otros inhibidores de la hidrolasa de la serina, inhiben la reacción de la gelificación.

Así en 1969, J.F. Cooper reconoció la aplicación de LAL en Pruebas de Pirógenos de productos parenterales, a pesar de que esta prueba "in vitro" fue usada inicialmente como un

mecanismo valioso en la investigación de endotoxinas, se consideró de mayor utilidad en esta area.

De allí que se prepara un lisado de células lavadas de amebocitos, reactivo indicador muy sensible de la presencia de endotoxinas. Este reactivo es preparado sangrando por punción cardiaca el corazón del *Limulus* maduro y sano. El amebocito de las células circulantes de la sangre, es cuidadosamente concentrado, lavado y lisado por efecto osmótico. El producto final es sensible al calor; son necesarios para su estabilidad la refrigeración, congelamiento o liofilización. Se valora contra endotoxina purificada y se acepta si detecta 1 ng./ml. o menor concentración de la endotoxina de referencia U.S.P., propuesta por la Food and Drug Administration para estandarizar la preparación del producto final y así regular su producción.

En 1971, Gooper, Levin y Wagner publicaron el primer estudio comparativo de la Prueba L.A.L. vs. Prueba de Pirógenos U.S.P. (12).

Solum (1973) describió ciertas características de la forma del gel y no gel, de la proteína. Además While Sullivan y Watson (1975) describieron la enzima coagulante.

2.2.- TECNICA DE LA PRUEBA DE LIMULUS.

El ensayo L.A.L. se prepara adicionando, reactivo reconstituido, a volúmenes iguales de la muestra líquida, en un pequeño tubo de vidrio para ensayo. La muestra se incuba, sin movimiento, a 37°C. por 60 ± 2 min. En seguida a la incubación, la prueba es evaluada invirtiendo los tubos de incubación 180°. Si el tubo de prueba muestra un gel sólido y firme que resiste la inversión, se considera positiva; si no forma gel o éste se rompe en la inversión, la prueba es negativa.

La prueba llega a ser cuantitativa si el reactivo L.A.L. es estandarizado primeramente contra una endotoxina purificada.

2.3.- CONDICIONES ESPECIFICAS DE LA PRUEBA.

Material de vidrio.- Debe ser esterilizado por calor seco. 200°C. por 2 Hrs. o 250°C. por lo menos 60 min.

Temperatura.- La temperatura de incubación debe mantenerse de 36 a 38°C. Se ha observado que la reacción se retarda fuera de este rango, la sensibilidad de esta prueba se reduce muy marcadamente a 25°C., mientras que se destruye a 45°C.

pH.- El pH del producto debe ser ajustado de 6 a 8, con solución de Acido Clorhídrico diluido, Hidróxido de Sodio o solución amortiguadora de fosfatos.

Incubación.- El tubo debe permanecer sin agitación durante la incubación; se ha observado que una agitación previa puede destruir el gel irreversiblemente llevando a un resultado falso-negativo.

Control Positivo.- Util en la comprobación directa de inhibiciones por agentes químicos, antibióticos, excipientes; muchos inhibidores son superados por ajuste del pH o por medio de dilución.

Se prepara contaminando una alícuota de la muestra problema con solución concentrada de endotoxina valorada.

Control Negativo.- Para detectar contaminación inadvertida en los diluentes utilizados.

Limpieza del material.- Es de primordial importancia que el material de vidrio esté limpio ya que pequeñas trazas de jabón, álcalis, ácidos u otros contaminantes pueden reflejar un falso-negativo. Es recomendable completar 3 ciclos de lavado, secado y esterilizado en caso de material de primer uso -

para eliminar silicatos y substancias residuales propias de su manufactura.

2.4.- SU RELACION CON LA PRUEBA DE PIROGENOS U.S.P.

La Prueba de Limulus y la Prueba de Pirógenos U.S.P. no pueden ser comparadas directamente ya que se deben establecer precondiciones para que la comparación sea válida.

La respuesta pirogénica en conejos es independiente de la cantidad de pirógenos inyectada por unidad de peso del animal; las primeras dosis de sensibilidad son dependientes. En contraste, la Prueba de sensibilidad de Limulus depende esencialmente del tiempo y de la concentración porque el rango de opacidad del gel formado, en el punto final, es dependiente de la concentración de endotoxina. Esto es, el tiempo de gelación se incrementa cuando la concentración de endotoxina decrece. Por lo tanto, cuando se comparan la sensibilidad de las dos pruebas a una concentración pirogénica, el volumen en la Prueba U.S.P. y el tiempo en la Prueba de Limulus deben ser constantes. El volumen no es una variable en la Prueba de Limulus porque se utiliza constante, generalmente de 0.1 a 0.2 ml.

Griesman y Hornick indican que el conejo y el hombre tienen respuestas similares a un nivel pirogénico dado en una dosis por kilogramo. El factor de seguridad para ambas pruebas puede ser determinado por dosis, para parenterales de pequeño y gran volumen. Cuando un parenteral de gran volumen es administrado, este factor se acerca a 1; esto es, la seguridad en la Prueba de Limulus decrece cuando la dosis humana de un producto se incrementa. Esto ocurre porque la toxicidad de la endotoxina en el hombre y en el conejo es dependiente de la dosis, mientras que la Prueba de Limulus es

dependiente del tiempo y concentración de endotoxina. Así el punto, final para la formación del gel es dependiente de la concentración de endotoxina; y el tiempo de gelación se incrementa cuando la concentración de endotoxina decrece.

Cuando se administran parenterales de gran volumen el factor de seguridad se aproxima a 1. Para *Limulus* éste decrece cuando la dosis humana (ml./Kg.) de un producto se incrementa.

2.5.- APLICACIONES ESPECIFICAS.

Los agentes quimioterapéuticos son una clase de productos farmacéuticos que tienen un alto índice de efectos adversos como son: reacción febril frecuentemente presente después de la administración, potencialización entre la endotoxina y agentes antitumorales. Por ejemplo en el tratamiento L-Asparaginasa las reacciones adversas son: vómito, náuseas, fiebre y cambios hematológicos; estas reacciones son debido en parte a la contaminación con endotoxina, ya que esta enzima antileucémica es preparada a partir de *E. coli* o *Erwinia*. Por lo tanto la prueba farmacopeica que indica la U.S.P. en conejos es inadecuada dado que esta especie es sensible a los efectos tóxicos de la L-Asparaginasa, resultando así la valiosa cooperación de la Prueba L.A.L. para controlar la calidad pirogénica no sólo de estos productos, sino también de radiofármacos, homoderivados, etc. (13).

CAPITULO III

3.1.- CRITERIOS BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA.

Una de las tareas de la Microbiología en la Industria Farmacéutica es la de salvaguardar satisfactoriamente la calidad microbiológica de los medicamentos.

Esta labor debe ser complementada por un sistema de seguridad integrado que incluya medidas preventivas (higiene) y relevantes Controles Microbiológicos (de productos en proceso y terminados), como:

Muestreo y análisis de materias primas y materiales.

Higiene en la Manufactura.

Control microbiológico de los Procesos de Manufactura.
(Condiciones ambientales, equipo, servicios, etc.)

Muestreo y análisis de graneles y producto final.

Involucra Controles en Proceso que son medidas de observancia ejercidas desde la recepción de materia prima y llevadas durante la manufactura, hasta la transformación completa en producto terminado.

Los componentes usados en la manufactura de productos estériles requieren tratamiento especial para hacerlos adecuados a su uso. La preparación de formas de dosificación estéril implican conllevar a la vez los diferentes elementos del producto de tal forma, y bajo tales condiciones, que el producto debe estar libre de contaminación por microorganismos viables. Los productos parenterales deben estar siempre protegidos de contaminaciones particulares y materiales pirogénicos.

Los procesos estériles requieren que todos los elementos -- del producto, incluyendo componentes estériles, equipo de manu-- factura y acondicionamiento, condiciones ambientales y personal que lo elabora, deben ser adecuadamente controlados para asegurar su esterilidad durante todo el tiempo del proceso.- (Se recomienda hacer pruebas de reto al sistema).

Por lo tanto, si las Buenas Prácticas de Manufactura sugie-- ren que las condiciones que prevalezcan durante la misma no de-- ben fomentar la proliferación microbiana, entónces requiere eva-- luar la carga de microorganismos en varios sitios por medio de -- un Monitoreo Microbiológico (14). Esto es, la función de los mo-- nitoreos microbiológicos consiste en medir el grado de eficien-- cia de los Controles en Proceso para determinar la carga micro-- biana que emane de las Fuentes de Contaminación predominantes en el Sistema (aire, agua, vapor, contenedores primarios del producto, equipo, materias primas, personal, etc.); además para evaluar procedimientos de limpieza de planta suficientes que sirvan como índice de niveles de sanitización departamental; para establecer sobre estas bases los resultados de un proyecto que en funciona-- miento reducirá fallas en la calidad.

Un programa de monitoreo debe establecer el perfil microbiológico (a base de registros) de cada muestreo incluido en el mismo. Las causas que pueden afectar a estos perfiles son: arrancar un nuevo proceso, modificar un proceso existente, nuevos compo-- nentes, un cambio en el procedimiento, la instalación de un nuevo equipo, diferencias significativas en los resultados de las -- pruebas microbiológicas, facilitar la revisión, reanudación de -- operaciones suspendidas por alguna causa no inherente al proceso (falla mecánica o energía eléctrica), cambios de personal, etc.

Los perfiles microbiológicos o biocarga se usan para esta--

blecer los requerimientos mínimos de calor y tiempo, distribución, penetración etc. en la validación de los procesos de esterilización.

Cada laboratorio farmacéutico debe recoger datos para establecer lineamientos internos que puedan ser usados como soporte de los planes en acción, en respuesta a los resultados de las pruebas. Los planes pueden involucrar requerimientos adicionales de operaciones de limpieza, muestreo y ensayos. Pueden variar, por lo mismo, de un sitio a otro, lo que indica que la frecuencia del monitoreo se ajusta a la historia de cada uno de ellos. Deben estar por escrito y del conocimiento del personal, tanto de manufactura así como también de Control de Calidad. Los resultados de las pruebas deben ser revisados por el Departamento de Producción. Cuando se requiera acción correctiva, ésta debe ser formulada para disminuir el riesgo de pérdida de un lote.

3.2.- EL HOMBRE COMO FUENTE DE CONTAMINACION.

El ser humano suministra las condiciones de vida eugénicas para una gran multitud de microorganismos.

Las posibles contaminaciones que emanan del hombre provienen en su mayor parte del pelo, oído, nariz, garganta, manos (heridas) y tracto intestinal.

Las rutas de transferencia son:

- Vía cabello (pelo).
- Vía aire.- Durante el habla, toser, etc.
- Vía el polvo.- Microorganismos o partículas de polvo transportados durante el movimiento.
- Transferencia directa de microorganismos.
O transporte mecánico propiciado por el Personal que labora en las Areas

Asépticas al no observar los reglamentos de las Buenas Prácticas de -
Manufactura por ignorancia, negli-
gencia o indiferencia, etc.

Una fuente potencial de peligro que emana del hombre son -
microorganismos portadores y eliminadores crónicos, que se re-
flejan con un marcado incremento de infecciones en el personal,
detectadas por el servicio médico a base de exámenes bacterioló-
gicos de heces, o bien si es el caso de portadores externos seña-
laremos como un ejemplo de fuentes infecciosas la menstruación
típica del personal femenino. Por otra parte, algunas firmas far-
macéuticas han reportado casos de enteritis causada por salmone-
la identificando: *S. heidelberg*, *S. tiphimurium*, *S. london*, etc.
y recomiendan el uso de una Prueba de Inmunofluorescencia para
portadores externos de la salmonella fecal. Se basa en la reac-
ción directa entre los anticuerpos marcados con FITC (Isociano-
to de fluoresceína) y los antígenos somáticos y flagelar de la
salmonella. Una ventaja de este método (que tiene buen reconoci-
miento por la F.D.A.) es la exclusión rápida de casos negativos.
Los hallazgos positivos necesitarán ser examinados posteriormen-
te siguiendo las reglas de la bacteriología convencional, exhaus-
tivas investigaciones hablan en favor de este procedimiento.
(15) (16) (17).

La constante preocupación del farmacéutico por mantener en
alto la calidad microbiológica de sus productos y ante la ausen-
cia de una pauta o directriz que evalúe sus controles para lle-
gar a un óptimo, ha hecho que éste conjunte una serie de obser-
vaciones particulares y las extrapole en la práctica a estándar-
es para hospitales, por ejemplo, donde la mano o guantes, den-
tro de un área aséptica no deben mostrar más de 0 a 2 colonias
por dedo. También es aplicable el Método de Lingnau (18) que su

giere lavar ambas manos en solución salina estéril y determinar subsecuentemente la carga microbiana por el Método de Filtración por Membrana tomando un máximo de 50 microorganismos, por ambas manos, como valor límite relativo.

Desarrolla técnica lógicas que demuestren la contaminación; tal es el caso de la placa Rodac para pequeñas superficies (como huellas dactilares o digitales, zapatos, etc.) y el Método de -- cultivo de Contacto Agarflex del Profr. Kans para grandes superficies de pared cuando son restregadas con escobillones o esponjas limpias.

Muchas de las posibles contaminaciones provenientes del hombre son producto de observaciones sistemáticas de eventos aislados como: desgaste de cofias, protección de boca, guantes, frecuentes cambios de ropa, areas de vestido, sistemas de limpieza adecuados, etc. (19).

Llevar controles Microbiológicos a intervalos considerables para mantener la higiene personal, reglamentar sobre técnicas de vestido y trabajos asépticos para confirmar los sucesos de estas evaluaciones de planta y codificar el éxito de los monitoreos.

Como un ejemplo ilustrativo de estos trabajos asépticos tenemos el monitoreo del lavado de las manos.

Desde el punto de vista como fuente de contaminación, son portadoras de microorganismos residentes y en otros casos potenciales acarreadores de contaminantes. Por lo tanto requieren de labores apropiadas de desinfección que esencialmente se sintetizan en 3 etapas:

a).- Lavado preliminar de las manos con agua corriente para disminuir carga bacteriana caracterizada por staphylococcus de - baja pirogenicidad.

cocus de baja pirogenicidad.

b).- Elección adecuada del antiséptico que remueva aquellos microorganismos restantes y difíciles de eliminar mediante el lavado simple. Así como un adecuado control y permanencia del mismo.

c).- Evaluación del procedimiento. Involucra los siguientes pasos:

1.- Restregarse ambas manos durante 1 min. exponiéndolas al chorro de agua.

2.- Utilice un cepillo y jabón líquido para lavarse ambas manos. Tómese 1 min para cada una. Enseguida enjuague durante 5 min. con Agua Estéril, recolectando el enjuague en un recipiente también estéril.

3.- Sumerja las manos a un recipiente que contenga Agua estéril y restréguelas durante 1 min. sin utilizar jabón.

4.- Repita el paso #2.

5.- Ahora nuevamente sumerja las manos en un recipiente que contenga (ejecute el paso #3).

6.- Utilice un cepillo y jabón (paso #2).

7.- Sumerja las manos a un recipiente ... (paso #3).

8.- Utilice un cepillo y jabón (paso #2).

9.- Sumerja las manos a un recipiente (paso #3).

10.- Cuantifique la carga microbiana depositada en cada recipiente de enjuague identificado previamente en los pasos 2, 3, 5, 7 y 9. Esto lo consigue aplicando el Método de Cuenta Total de Microorganismos, haciendo 5 diluciones de cada muestra e inoculando 1, 2 y 4 ml. en placas de agar.

La optimización de esta técnica se hará dependiendo del análisis de los resultados que precisará los cambios que se le deban hacer con el propósito de adecuarla a las necesidades

específicas de cada area de trabajo, reflejándose éstos en los - ciclos o tiempo de lavado necesarios para garantizar una asepsia adecuada de las manos.

3.3.- EL AMBIENTE COMO CAUSA DE CONTAMINACION.

Existen diversas causas o formas de distribución de contami nación. De las más comunes:

- Inherentes al aire y transmisión directa de microorganismos que surgen del hombre.
- Contaminación de microorganismos por defectos de diseño del area, acabados, construcción, localización y operación.
- Microorganismos inherentes al aire difundidos a través -- del aire acondicionado, difusores, etc.
- Flujos innecesarios de proceso.

El seguimiento de estas rutas de diseminación se efectúa -- por medio de Controles de Limpieza de Areas de Trabajo cuya fina lidad consiste en:

a).- Detección de microorganismos sedimentados sobre la su perficie de componentes de equipo.

b).- Detección de microorganismos suspendidos, los cuales - están en parte en condición libre y parte, ligados a partículas de polvo sobre gotitas de agua.

La determinación de superficies contaminadas es análoga a - la técnica del isopo, algodón o raspado; salvo que en este caso las placas reciben aditivos inactivadores contra el desinfectan te usado.

Los resultados de la cuenta y determinación del tipo de mi croorganismos proveen una valiosa información del personal bajo

exposición y la higiene del area (por ejemplo, en función del tiempo - para instalación, servicio, equipo, personal y procedimientos).

El resultado deseado depende de la importancia del sitio probado. Según Kanz, en su reporte "Aseptic in der Chirurgie", Urban Und Schwarsenberg, Munich, Viena, 1971, el piso deberá exhibir no más de 7 microorganismos por Placa Rodac (correspondiendo a poco más o menos $25 \text{ cm.}^2 = 4 \text{ pulg.}^2$).

Los métodos usados para detectar partículas en el aire tienen sólido fundamento probado; están basados en la sedimentación, filtración y aplicación por rodamiento o aplicación por rociado. La única diferencia, con respecto al conteo de partículas vivas, es que en la cuenta de microorganismos en el aire se incluye medio nutritivo en el procedimiento. No hay diferencia significativa entre ambos procedimientos; biológicos y físicos. Su elección va a depender del enfoque que presente el Monitoreo Microbiológico General que contempla aspectos bien específicos de servicios. Ejemplos: difusores para presurizar el área, y/o características de clasificación de áreas, aire laminar en zonas de llenado, sistemas de filtración de equipo (horno, autoclave, máquinas llenadoras, etc.), medio ambiente antes, durante y en el proceso de manufactura, etc.

Inexplicablemente cuentas altas de microorganismos en el aire, fuera de límites de alerta previamente establecidos (estadísticamente de acuerdo al área en que se detecte) requieren -- que la investigación bacteriológica sea extendida al aire acondicionado de la planta. Esta situación demuestra 3 fuentes de contaminación principalmente responsables:

a).- Posible crecimiento microbiano durante el enfriamiento del aire en la aleta de condensación.

b).- Alta cuenta de microorganismos patógenos como Pseudomona aeruginosa y Klebsiellae en los tanques humidificadores -- del sistema especial de recirculación.

c).- La sección del ducto entre el último filtro (filtro - principal) y la salida del aire.

Se ha encontrado que los microorganismos se multiplican rápidamente en forma particular en los humidificadores tipo rociadores (spray) de la recirculación después de la renovación uniforme del agua.

3.4.- LOS INGREDIENTES ACTIVOS, EXCIPIENTES Y MATERIALES COMO CAUSAS DE CONTAMINACION.

Una fuente potencial de peligro son indiscutiblemente los ingredientes activos y excipientes. Estudios reportan que predominantemente los productos naturales (20) (como por ejemplo: sustancias de plantas, animales, microbiológicas o de origen mineral y tintes, éstos últimos en virtud de su particular afinidad por las células bacterianas) son portadores de contaminantes en un alto grado.

Sin embargo, elegir tal o cual clasificación sería riesgoso y poco ilustrativo al excluir la Materia Prima Universal en todo proceso de manufactura de un inyectable. Tal es el caso -- del AGUA como "elixir" de la vida para muy diferentes microorganismos. Diversos análisis del comportamiento de bacterias en -- Agua Desmineralizada, presencia de hongos, levaduras y bacterias (por separado) en Agua Bidestilada, reflejarán su importancia y contribución a la calidad pirogénica del producto finalmente manufacturado.

Así encontramos que los microorganismos Gram-negativo del Agua agrupados en la especie Acromabacter tienen una concentra-

ción límite de pirógenos entre 10^4 y 10^5 microorganismos por mililitro de acuerdo a experimentos controlados con la Prueba de Limulus. En presencia de ellos, una muestra de Agua contaminada inicialmente con 10^2 microorganismos/ml. nos eleva la pirogenicidad después de uno o más días almacenada a temperatura ambiente. Esto puede representar una pauta a seguir en la correlación contra el Plan de la F.D.A. para parenterales que requiere, que el agua usada para manufactura debe ser substituida después de 24 Hrs. de colectada y mantenida en condiciones adecuadas de almacenamiento, si no es posible a 80°C .

Esto nos hace pensar en la implantación de un Control Biológico regulador, validado y monitoreado en forma rutinaria, para conocer el riesgo en proceso de Agua, por microorganismos vivos y sus productos de descomposición.

Por ejemplo, para "Agua Inyectable" los Controles en el -- Proceso se extienden a: Cuenta de Microorganismos, Identificación de Contaminantes y, la Prueba de Limulus. Puesto que son precisamente típicos los microorganismos en aguas pirogénicas, éstos son fundamentalmente abarcados por la Prueba de Limulus. La Prueba Farmacopeica de la U.S.P. (21) puede estar substancialmente fuera de consideración para los Controles en Proceso. La F.D.A. sugiere emplear métodos alternos a la Prueba del Conejo para esta finalidad, simplemente comprobando y estipulando que son métodos precisos y sensibles. Así podremos decir, según informes bibliográficos, que la sensibilidad comparativa es: Prueba de Conejo = De 1 a 10 picogramos de endotoxina, mientras que la Prueba de Limulus reporta de 0.05 a 0.1 picogramos de endotoxina.

El Estándar de Calidad para las diferentes clasificaciones del Agua está determinado por el uso destinado. Razón por la --

que en el caso de Agua Purificada, la Cuenta e Identificación de Microorganismos se utilizan como criterio. Así la F.D.A. publica proposiciones en sus reglamentos que contemplan los límites para productos inyectables de gran volumen en el Control de Calidad microbiológico (22).

En el siguiente esquema se encuentra el Estándar de Calidad propuesto por la F.D.A. para "Agua de Infusión":

Uso destinado:	Límite de calidad microbiológico propuesto por 100 ml.
Lavado y enjuagado inicial de contenedores de producto, contenedores primarios, -- equipo, etc.	Menor o igual a 50 microorganismos en 3 muestras consecutivas de 250 ml.
Para manufactura o enjuague final.	Menor o igual a 10 microorganismos en 3 muestras consecutivas de 250 ml.
Para enfriar el producto -- después de esterilizar.	Menor o igual a 1 microorganismo en 3 muestras consecutivas de 1,000 ml.

3.5.- TRATAMIENTOS PARA PURIFICAR EL AGUA.

Si el reactivo L.A.L. es más sensible que el conejo, es posible valorar soluciones que contengan concentraciones de endotoxinas inferiores al nivel pirogénico, con él se detecta la presencia de endotoxinas y posteriormente se eliminan, antes de que alcancen altos niveles pirogénicos que van desde más de 1,000 nanogramos/mililitro (10,000 Unidades de Endotoxina/mililitro) a menos de 1 nanogramo. (10 U.E.). En la práctica se ha encontrado en depósitos de abastecimiento de agua (cisternas), más sin embargo y aunque en forma temporal el más bajo y menos variado nivel se ha detectado en sistemas abastecidos por pozos o manantiales. Esto indica que el Agua Potable requiere de un tratamiento previo, llamado CLORINACION, para remover pequeñas cantidades de endotoxinas que permanecen en los sistemas de agua, después de que las bacterias que las producen han sido muertas (23).

Otro pretratamiento más frecuentemente usado en los sistemas de purificación de agua consiste en SUAVIZACION. Las aguas suavizadas son bajas en carga bacteriana y por consiguiente de endotoxina. A causa del suavizamiento no se remueve cloro del agua de alimentación; y el crecimiento bacteriano se mantiene en observación. La alta concentración de sales inhibe el desarrollo bacteriano y mata en forma extensiva (lisis osmótica) bacterias que pueden entrar al sistema. El inconveniente de este procedimiento estriba en que algunas veces causa espuma en el destilador permitiendo que se cuecen en ella endotoxinas, como medio de transporte.

FILTROS DE CARBON.- Utiles para remover cloro del Agua de alimentación.

SISTEMAS DE INTERCAMBIO IONICO. O comunmente llamados deio

nizadores, eliminan sales inorgánicas por efecto electrostático. (24)

Estos dos últimos recursos pueden convertirse en "Factores pirogénicos" y causar carga bacteriana tan severa que las endotoxinas son transportadas hasta el Agua como producto final. Para remover estas sustancias del agua, disminuirlas o eliminarlas, como tales o como parte integral de los sistemas para surtir agua con un grado de pureza de conformidad a especificaciones farmacéuticas, existen métodos como:

DESTILACION.- Un condensador recibe exclusivamente vapor - sobrecalentado de agua. Impide que grandes gotas de agua acarren sustancias pirogénicas.

OSMOSIS INVERSA.- En este caso, la endotoxina es excluida a causa de su tamaño. Generalmente son agregados con peso molecular de 1,000. Aunque también se pueden encontrar sin agregar en forma de discretas unidades activas de lipopolisacáridos con peso molecular aproximado a 10,000. En este sistema fácilmente se remueven estas moléculas relativamente grandes, etc.

3.6.- PROCEDIMIENTO PROPUESTO DE VALIDACION PARA UN PROCESO DE ABASTECIMIENTO DE AGUA GRADO INYECTABLE.

Su finalidad, en esencia, consiste en: Asegurar que las endotoxinas están en verdad ausentes del Agua. Un método de validación contempla aspectos muy importantes como: determinación total de microorganismos viables, partículas no viables de materiales y sustancias oxidables.

Es muy posible que la presencia de endotoxinas se correlacione con la existencia de estas sustancias puesto que, como se ha estipulado anteriormente, las fuentes contaminantes provienen de bacterias viables Gram-negativo y la naturaleza de las endotoxinas ocurrentes naturalmente son ambas partículas y orgánicas.

Una secuencia típica, a seguir, para validar el contenido - de endotoxinas sería la siguiente:

1.- El Sistema es instalado y posteriormente se completan chequeos funcionales y mecánicos.

2.- Se selecciona e identifica la localización de los muestreos por medio de un diagrama auxiliar. Incluye localizaciones de los desagües fijos, los contenedores de almacenaje, desagües de uso, y puntos a lo largo de la línea de distribución los cuales presumiblemente puedan convertirse en fuentes de contaminación (por ejemplo desagües para drenar, puntos bajos con llaves - de acceso y puntos muertos).

3.- El muestreo se efectúa de acuerdo a un itinerario fijo y debe conducirse por un período de tiempo que el Sistema determine después de haber pasado a través de algunos ciclos acordes al uso típico.

4.- Hacer el muestreo de tal forma que se prevenga la contaminación externa de la muestra. Es recomendable despirogenizar - los desagües a base de calentamiento con sopletes manuales de -- gas. Si esto no es posible por ubicación de la toma o por situaciones de planta, entónces limpiaremos la superficie con un agente desinfectante teniendo cuidado de enjuagar cuidadosamente con agua destilada libre de pirógenos. Con ello no solo removeremos pirógenos sino de paso también aquellos residuos superficiales - de substancias que puedan afectar la Prueba L.A.L. (25)

5.- Posteriormente enjuagar la toma con la misma agua antes del muestreo, utilizando pequeñas cantidades.

6.- Es importante además recolectar muestra en forma similar pero sin enjuagar, para tener una ideal del grado de endotoxina estructural que amenaza perturbar otros puntos del sistema.

7.- Los colectores de muestras pueden ser de vidrio o plástico. Si se usan de vidrio, deben ser de boca ancha y estar cubiertos con papel aluminio al despirogenizarlos a 180 grados C. por lo menos 3 Hrs., ó 250°C. por un mínimo de 60 min. por calor seco y enfriados antes de su uso. Elija material de vidrio de primera calidad para evitar que las paredes absorban endotoxinas, complete un mínimo de 3 ciclos lavado-despirogenizado antes de usarlo.

8.- Prueba cada muestra por duplicado. Para la validación es usualmente suficiente tener unos Límites de Ensayo, pero sí es importante considerar que éstos sean un poco inferiores a los establecidos para el producto final. Esto es, si el producto final debe ser Agua Estéril para Inyección con un Límite de 0.1 - Unidades de Endotoxina/mililitro, entónces el límite para la validación debe establecerse a 0.05 U.E./ml. Otra forma de establecer los límites de trabajo consiste en primero evaluar la calidad del sistema por el procedimiento de gel-no gel como una forma semicuantitativa o bien elegir otra metodología L.A.L. para luego fijar sus condiciones.

Este desglose de prácticas o procedimientos para una Validación, quizás corto para las condiciones de algunos Laboratorios Farmacéuticos o demasiado severos para otros, al fin prototipo, demuestra abase de registros y análisis estadísticos de los fenómenos observados, si el Sistema está validado. Condición que será cumplida si no se encuentran endotoxinas detectables, o si la endotoxina encontrada es inferior al Límite establecido para el producto final de tal manera que provea un margen de seguridad adecuado.

3.7.- LOS PROCESOS DE MANUFACTURA COMO CAUSAS DE CONTAMINACION.

Los controles en proceso, de la manufactura, sirven en parte para determinar en forma directa fuentes potenciales de contaminación. Ejemplos de posibles fuentes son: gases suministrados (tales como aire comprimido, nitrógeno, etc.) a tanques de filtración y llenado, equipo liofilizador, máquinas llenadoras, accesorios, etc.

Generalizando, la operación de filtración se apoya en el uso de Nitrógeno y/o gas inerte como elemento de presurización y es monitoreado microbiológicamente muy de cerca ya que detecciones repetitivas de microorganismos así lo indican y demuestran que normalmente se han encontrado bastoncillos gram-positivos con formación de esporas resistentes a 80°C. por 10 min. y requiriendo de 12 a 14 días a 37°C. para crecer.

Esto nos hace pensar en preparar un programa de muestreo rutinario de los Sistemas de Filtración con metodología adecuada, que contemple la utilización de un líquido contaminado ligeramente y una subsecuente Prueba de Esterilidad para medio filtrado y membrana utilizada. Por añadidura se recomienda la Prueba de Burbuja para verificar la integridad de la membrana, al principio y al final del proceso (27).

La literatura recomienda *Pseudomona diminuta* o *Serratia marcescens*, ésta última para filtros de 0.45 micras, como Control Microbiológico de microorganismos para probar el poder de retención de los filtros (26). Por razones de seguridad algunas pruebas son preparadas fuera del Area de Producción.

Una parte substancial de los Controles en Proceso consiste en el chequeo funcional de las técnicas para reducir la carga microbiana en producción, contenedores, etc.

Estas pruebas funcionales pueden clasificarse como sigue:

CONTROLANDO TECNICAS FISICAS.

P A R A M E T R O	ESTERILIZACION CALOR HUMEDO	ESTERILIZACION CALOR SECO	ESTERILIZACION OXIDO DE ETILENO
TIEMPO	X	X	X
TEMPERATURA	X	X	X
PRESION	X	-	X
AIRE RESIDUAL	-	-	X
CONCENTRACION DE GAS	-	-	X
HUMEDAD	-	-	X

CONTROLANDO TECNICAS BIOLOGICAS

PROCEDIMIENTO	MICROORGANISMO INDICADOR
VAPOR	BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS (ATCC 7953)
CALOR SECO	BACILLUS SUBTILIS VAR. NIGER (GLOBIGII) (ATCC 9372)
RADIACION DE OZONO	BACILLUS PUMILUS (ATCC 27142)

CONTROLANDO TECNICAS QUIMICAS

M E T O D O	TIEMPO	TEMPERATURA	VAPORES DE SATURACION	OTROS	FUNDAMENTO
PUNTO DE FUSION		X			LAS SUBSTANCIAS FUNDEN DENTRO DE UN RANGO DE TEMPERATURA DE ESTERILIZACION.
TERMOMETRO DE MAXIMA		X			
COLORES DE MEDICION DE TEMPERATURA		X			IRREVERSIBLES CAMBIOS DE COLOR POR DESCOMPOSICION O CONVERSION DE SUBSTANCIAS
PUNTO DE FUSION RETARDADO	X	X			TUBOS PARA PUNTO DE FUSION DE DOBLE CHAQUETA
AMARILLENADO DE PAPEL Y CELULOSA	X	X			
REACCIONES QUIMICAS	X	X			HIDROLISIS DE SOLUCIONES ACUASAS DE ESTERES QUE INDICAN CONTROL DE TEMPERATURA Y MEZCLADO.
CAMBIOS DE COLOR ANTE LA ACCION DE LA HUMEDAD Y EL CALOR	X	X	X		COMPLEJA ADICION DE AGUA AL CLORURO DE CROMO.
CAMBIOS DE COLOR ANTE LA ACCION DEL GAS	X		HUMEDAD	OXIDO DE ETILENO	REACCION ENTRE EL OXIDO DE ETILENO Y UNA SUBSTANCIA INDICADORA.

Los resultados obtenidos modifican aumentando o disminuyendo los controles en proceso; nos permitirán variar los intervalos de asepsia o esterilización de viales y frascos ampolla dependiendo de los requerimientos; reflejarán no sólo la realidad de los sistemas de filtración en uso, sino más allá, condiciones de ropa de manufactura, operaciones de llenado incluyendo recipientes y contenedores finales. Indicarán la calidad microbiológica del producto inmediatamente antes de ser llenado, serán un control del llenado y proceso de sellado incluyendo material de empaque primario, por medio de soluciones nutritivas estériles.

3.8.- CONTROLES EN PROCESO Y TECNICAS DE EVALUACION.

Las necesidades internas de cada área de trabajo contempladas en un proyecto de evaluación microbiológica o monitoreo, hacen que éste sea específico y único dadas las características idiosincráticas de ubicación, clima, tipo de labores desarrolladas en él, etc.; por lo cual anotaremos sugerencias que describan procedimientos de prueba y breves bosquejos que generen un programa tipo para determinar la carga microbiana en los procesos ambientales al manufacturar un producto estéril. Estos procedimientos se apoyan en los siguientes Métodos, listados en orden alfabético, tomando como límites de ensayo los estipulados en la Farmacopea de los Estados Unidos.

Determinación del Punto de Burbuja. Es una prueba no destructiva para confirmar la integridad de filtros-membrana. El medio filtrante (membrana) es mojada con el líquido por filtrar, la presión del gas es ligeramente incrementada hasta que aparece una serie de burbujas por el extremo final de una manguera unida previamente a la parte inferior del sistema filtrante y sumergida en un recipiente con agua. La presión a la que apare-

cen las primeras burbujas se registra como el Punto de Burbuja y se relaciona con la longitud del poro de la membrana filtrante (27). Es característico para cada solución y/o sistema filtrante.

D.O.P.- La prueba con dioftilftalato es usada para determinar la eficiencia relativa de filtros HEPA. Dioftilftalato es una substancia química seca que puede ser aerosolizada para unificar tamaño de partícula a 0.3 micras de diámetro. Cuando es forzada bajo presión contra la corriente del aire de salida de un filtro absoluto, se pueden detectar los orificios indeseables usando un detector fotométrico.

La Prueba de Fermentación de Lactosa se usa para evidenciar en forma presuntiva la presencia de Escherichia coli u otras enterobacterias gram-negativas en muestra de Agua. De obtener resultados positivos, la prueba debe ser confirmada y completada con otros ensayos determinativos.

La Prueba del Número Más Probables comunmente conocida como la Prueba de Dilución Múltiple en tubo, se usa para cuantificar bacterias en muestras. Se preparan series de tubos conteniendo 9 ó 90 mililitros de medio de cultivo líquido estéril (por ejemplo, medio de cultivo de caseína soya), y el primer tubo se inocula con 1 ml., 10 ml., 1 g. ó 10 g. de muestra. Cada tubo de la serie recibe 1 ml. del tubo anterior por medio de una pipeta estéril. El tubo final de la serie exhibe crecimiento que enumera el número más probable de bacterias en la muestra original.

Método Directo.- Usado sólo para muestras de Agua donde la cuenta microbiana total es tan alta que las cuentas de colonias pueden hacerse usando la técnica de filtración por membrana.

La técnica de Vaciado en Placa ó, Cuenta Total de Microor-

Sanismos Aerobios, implica diluir 10 ml. o diluir 10 g. de la muestra en 90 ml. de diluyente estéril y pipetear una cantidad en cajas Petri de 100 x 20 mm. El medio de cultivo a 50°C. es vaciado sobre la muestra y la caja Petri se inclina y rota cuidadosamente para mezclar el medio de cultivo y la muestra. Se coloca la tapa de la caja una vez solidificado el medio y se incuba invirtiéndola hacia arriba por 72 Hrs. o más. Las bacterias se cuentan auxiliándose con una fuente de luz (Cuenta Colonias).

La Prueba Rodac se prepara con placas Rodac que son cajas Petri especialmente modificadas conteniendo medio de cultivo sólido cuya superficie convexa se extiende arriba de las paredes de la base del plato. La base es generalmente gravada con un mallage de 1 mm.² que es visible a través del medio. La superficie del agar es presionada suavemente contra la superficie a evaluar y la tapa es recogida. Se determina el número de microorganismos por unidad de area después de ser incubada. Permiten evaluar las operaciones de limpieza y sanitización de Areas Asépticas. Con ello se establece un Control Microbiológico que indica:

a).- Frecuencia de período de limpieza y sanitización.

b).- Registro de los resultados obtenidos al aplicar el recurso de reevaluación de Areas. Necesario cuando se sospecha -- que ésta no reúne las condiciones de trabajo por modificaciones imprevistas, inyección de aire interrumpido, fallas en la energía eléctrica, etc. Este recurso es útil para, además, reconocer el grado de limpieza que guardaba cierta area de trabajo antes de ser sanitizada.

Se deben exponer un número determinado de placas dependiendo del tamaño del cuarto, equipo, muebles y número de personas

involucradas en las operaciones de rutina.

Los límites de alerta se establecen después de 6 evaluaciones. Si algún resultado sobrepasa el límite de alerta establecido se deberá tomar la acción correctiva necesaria.

La Prueba de Exposición de Placas se prepara con cajas Petri de 100 x 20 mm. que contienen agar digerido de caseína-soya u otro medio adecuado. Se establece la localización de los puntos de muestreo por medio de un diagrama, así como la frecuencia con que se van a exponer. Las placas deben limpiarse en su superficie externa con una solución desinfectante (por ejemplo Isopropanol al 70%) y son colocadas con la tapa removida, en el lugar indicado. Los microorganismos aerobios son recolectados al azar sobre la superficie del agar durante un período de tiempo discreto procurando hacer el muestreo cuando se observe mayor actividad dentro del área. Los contaminantes se cuantifican después de la incubación (28).

Como resultado de esta operación, estaremos controlando la calidad del aire inyectado y por consecuencia, la integridad de los filtros HEPA y la eficiencia del sistema.

La Recolección de Partículas Viabiles en muestreos de aire comprimido o muestreos sobre agar se realiza en placas de vidrio de 150 mm. de diámetro por 25 mm. de altura conteniendo agar -- TGE (Extracto de glucosa y tripticaseína) bajo rotación circular, en la que incide una rendija que drena aire a una velocidad variable mayor de 28 Lts./min. Ajustando la velocidad de rotación del plato y el volumen de aire muestreado, de acuerdo a las condiciones ambientales esperadas, se establece la relación contaminación/tiempo. Los límites de alerta, en este caso, son de -- 0.1 microorganismos por pie cúbico de aire. Así para 30 min. -

correspondería 3 microorganismos por cada 30 pies cúbidos de --
aire.

El muestreador de aire comprimido no se puede esterilizar; sólo se sanitiza con alcohol isopropílico filtrado u otro agente desinfectante no corrosivo.

La Prueba de Esterilidad se usa para determinar contaminaciones con microorganismos en productos que pretender ser estériles. Se disponen de 2 métodos. En el Método Directo el medio de cultivo estéril recibe la muestra inóculo directamente. El Método por Filtración implica pasar la muestra a través de una membrana previamente esterilizada donde se retiene el contaminante. Inmediatamente después, ésta es incubada en un medio nutritivo adecuado (29).

El muestreo de superficies discretas, por medio del Método de Raspado "Swabbing", se realiza con pequeños palillos sopor--tando algodón en unos de los extremos, totalmente estériles. - Útiles en aquellas areas difíciles de alcanzar por su localización. Los cotonetes son colocados en tubos con medio de cultivo líquido u otro; finalmente se hace una determinación microbiana.

La Prueba del Llenado de Viales o Llenado con medio (30) - se usa para retar y validar la efectividad de los procedimientos de esterilización, equipo de llenado y sistemas de producción en general. Se pasa medio de cultivo líquido estéril a través del equipo que se usa en el envasado de graneles (productos) estériles, y se dosifican los viales, previamente tratados bajo condiciones y volumen que estipula el proceso de manufactura. - Los viales llenos y asépticamente sellados son incubados a temperatura, e inspeccionados para detectar crecimiento microbiano. En la Tabla siguiente se sugiere un Programa para Monitorear la Calidad Microbiológica de Productos Estériles.

Paredes y pisos:

Area de Pruebas de Esterilidad

Areas Controladas

Areas Críticas

Aire filtrado (HEPA):

Areas Controladas

Areas Críticas

Area de Pruebas de Esterilidad

Materia Prima

Graneles

Equipo de Producción:

Tanques

Manueras

Equipo de llenado

Aire comprimido

Agua potable

Agua deionizada

Agua destilada

Filtros Absolutos (HEPA)

Producto terminado

	Filtración por Membrana	Materia Prima	Pruebas de Cuenta total	Micro. P. aerob.	Fermentación de Lactosa	Placas Rodac	Inopos	Inyección de aire	U.C.P.	Velocidad del flujo de aire	Gránulos	Pruebas de llenado	Prueba de Esterilidad	Prueba de Pirógeno
Area de Pruebas de Esterilidad					*	*	*							
Areas Controladas														
Areas Críticas														
Area de Pruebas de Esterilidad														
Materia Prima	*	*	*											*
Graneles	*	*	*											
Tanques							*							
Manueras	*											*	*	
Equipo de llenado												*		
Aire comprimido	*										*			
Agua potable	*	*	*	*										
Agua deionizada		*	*	*	*									
Agua destilada	*	*	*	*										*
Filtros Absolutos (HEPA)								*	*					
Producto terminado	*	*										*	*	

Tabla # .- Esbozo de un Programa para Monitorear la Calidad Microbiológica de Productos Estériles. La factibilidad de su aplicación dependerá de las condiciones que prevalezcan en particular.

4.1.- PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

4.1.- PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

4.1.1.- ESTABLECIMIENTO DE LA PRUEBA DE PIROGENOS IN-VITRO L.A.L. EN PROCESO Y SERVICIOS AUXILIARES.

INFORMACION TECNICA

BIO-ENSAYO Y
PARALELISMO

- + CARACTERIZACION DE UNA ENDOTOXINA ESTANDAR.
- + DOSIS PIROGENICA PROMEDIO (APD₅₀)

- + SENSIBILIDAD DEL REACTIVO SELECCIONADO.
- + CERTIFICACION PRECISION TECNICO ANALISTA

- + PRUEBAS EN PROCESO
RED DE AGUA

AGUA MUNICIPAL.
ENTRADA CARBON ACTIVADO
SALIDA CARBON ACTIVADO
SALIDA LECHO MIXTO
SALIDA TANQUE DISTRIBUCION
SALIDA MAQUINA LAVADORA
SALIDA DESTILADOR
TOMA AREA ESTERIL

METODOLOGIA:

APLICACION DE
PROCEDIMIENTOS
ESPECIFICOS PA
RA LA PRUEBA -
L.A.L. DURANTE
LA CUANTIFICA
CION DE ENDOTO
XINAS EN:

- + ENSAYO SOBRE MATERIA PRIMA
- + ENSAYO SOBRE MATERIA PRIMA EN SOLUCION
- + ENSAYO SOBRE CONTENEDORES PRIMARIOS.

- + ENSAYO SOBRE SERVI
CIOS

HORNOS
VAPOR
ATRE COMPRIMIDO

Este capítulo describe una Metodología particular de la Técnica de Limulus orientada a la detección de fuentes pirogénicas.

Si bien la realización de esta Técnica es sencilla y no requiere profundos conocimientos sobre la materia, es deseable que la persona responsable de su ejecución tenga bases científicas - que le permitan formarse un juicio de las experiencias diarias y capitalice las enseñanzas integrando una metodología fundamentada en los siguientes puntos:

A.- Comprender la Técnica a seguir que se detalla en páginas subsecuentes.

B.- Conocer procedimientos de despirogenización de material de vidrio, artículos de laboratorio, y soluciones.

C.- Conocer el uso adecuado de un horno, baño de agua, balanza analítica, balanza granataria para el pesado de animales - de laboratorio, potenciómetro, autoclave, etc.

D.- Conocer el Sistema Métrico Decimal.

E.- Entender el concepto de molaridad.

F.- Saber cómo preparar diluciones.

G.- Conocer la preparación y almacenaje óptimo del reactivo de Amebocitos de Limulus y endotoxina de trabajo.

H.- Entender cómo y cuándo se preparan Controles Positivos y Negativos.

I).- Conocer técnicas asépticas aplicables al uso de material de vidrio, artículos de laboratorio, pipetas, jeringas, pesado de muestras, preparación de muestras, determinación de pH, etc.

J.- Conocer los criterios de aceptación o rechazo de una prueba en un evento determinado.

K.- Saber cómo cuantificar los niveles de endotoxina de una muestra.

Antes de entrar en materia, es importante resaltar que se trata de una prueba muy sensible que requiere de cuidados y observaciones iniciales que faciliten su comprensión y adecuada interpretación.

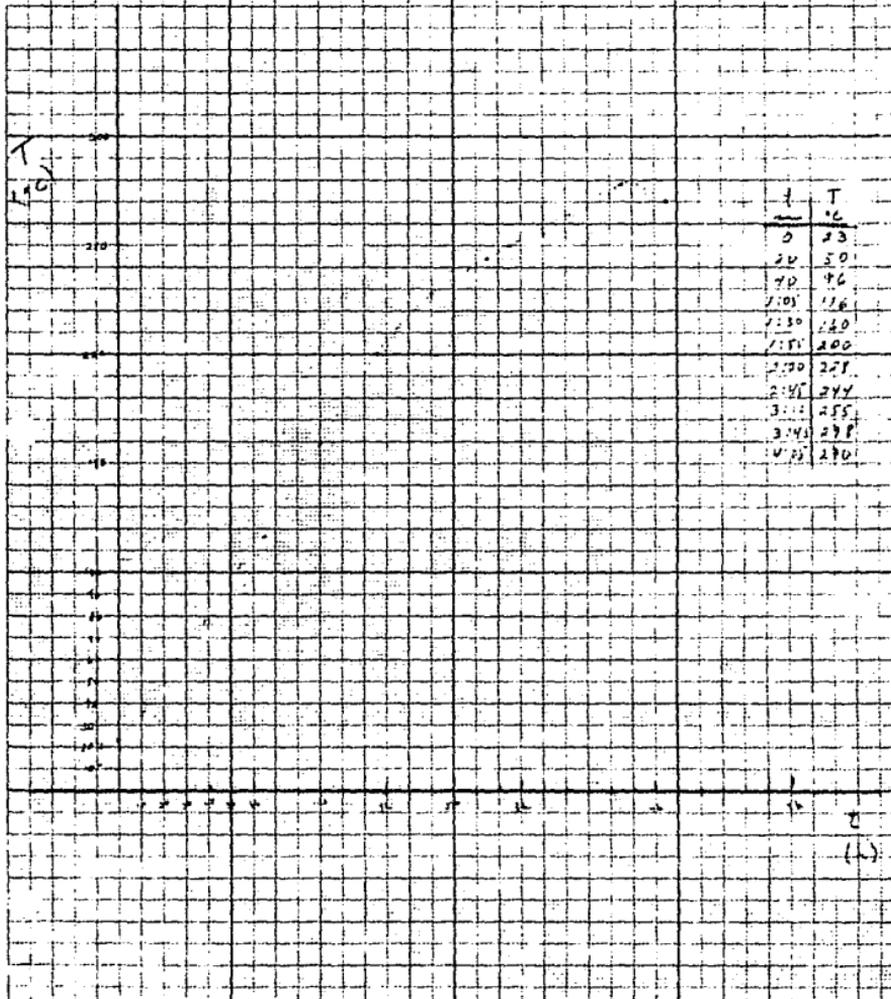
La preparación del material de vidrio requirió de una estufa que proporcionara temperaturas mayores de 250°C. Por ello es recomendable certificar que se alcanzan altas temperaturas calibrando el aparato mediante curvas de calentamiento periódicas que, aparte de garantizar la despirogenización del material, nos indiquen el tiempo de exposición necesario o requerido para cada estufa en particular, ya sea semi-vacía o totalmente llena. (Figs. 1 y 2).

Por otra parte, la necesidad de contar con Agua Bidestilada de alta calidad biológica y físico-química para reconstitución del reactivo (liofilizado) nos hizo pensar en un procedimiento que ha sido probado dando buenos resultados y pueden hacerse las modificaciones necesarias para obtener Agua apirogénica utilizable, además, como medio de dilución de muestras:

a).- Acumular agua recién destilada, b).- Bidestilar, - - c).- Adicionar carbón activado en un 2% v/v, d).- Esterilizar 15 min. a 121°C. 15 lbs. de presión, e).- Filtrar a través de membrana de 0.22 micras, f).- Ajustar el pH entre 6 y 7.5, -- g).- Envasar en frascos de 30 ml., despirogenizados y esterilizados (tapón) previamente, h).- Esterilizar nuevamente 15 min. a 121°C., i).- Refrigerar por no más de 30 días.

Otro requerimiento a cubrir para lograr una Metodología - que pueda ser utilizada en forma rutinaria fue determinar justamente cómo compararla con la actual Prueba U.S.P. de pirógenos, y nos referimos a una Substancia Patrón de Referencia examinada por ambos métodos.

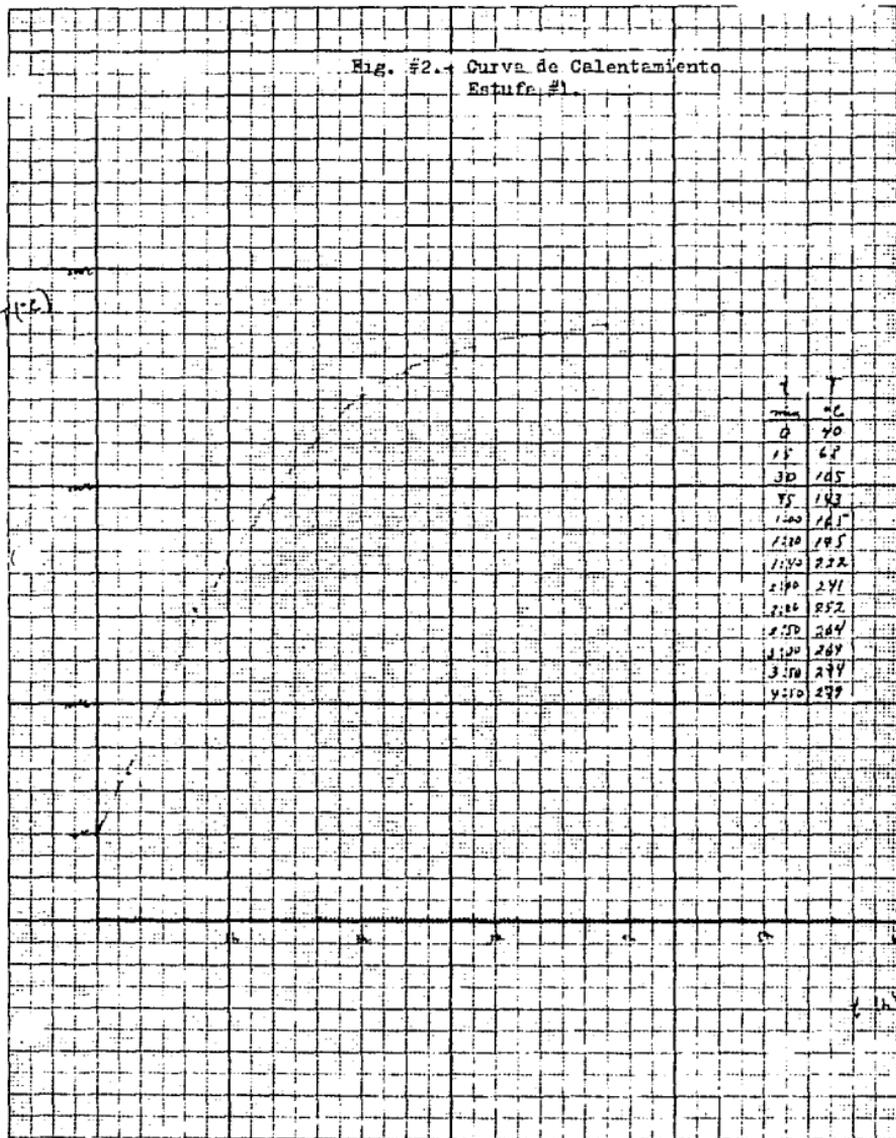
Fig. #1. Curva de Calentamiento Estufa #1.



t	T
0	140
20	150
40	160
60	170
80	180
100	190
120	200
140	210
160	220
180	230
200	240
220	250
240	260
260	270
280	280
300	290
320	300
340	310
360	320
380	330
400	340
420	350
440	360
460	370
480	380
500	390
520	400
540	410
560	420
580	430
600	440
620	450
640	460
660	470
680	480
700	490
720	500

(L)

Fig. #2. Curva de Calentamiento
Estufa #1.



4.1.2.- ENDOTOXINA ESCHERICHIA COLI.

Fue necesaria para determinar que el mismo tipo de molécula que generaba fiebre en los conejos, producía una reacción positiva en la prueba de Limulus.

Esta sustancia patrón de referencia se obtuvo finalmente de un cultivo de E. coli, después que la calidad de los patrones de referencia que le antecedieron cumplieron su cometido y fueron descontinuados (5 cambios en 7 años para obtener la referencia E.C.₅). Su objetivo primordial fue el de establecer un punto común donde coincidiesen los criterios de Calidad entre los productores del Lisado de Amebocitos de Limulus y la Oficina de Biológicos de la Administración Federal de Drogas (FDA). No obstante, las dificultades inherentes a la preparación de estándares de endotoxinas (tales como: poder de dispersabilidad y adsorción en el vidrio, forma de envasado, estabilidad y reproducibilidad de los ensayos in-vivo/in-vitro, características dependientes de su formulación) influyeron para que ambas partes enfocaran sus investigaciones y esfuerzos para controlar la sensibilidad del liofilizado en cuestión (reactivo L.A.L.). Así en 1982, la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica reconoce una Endotoxina Patrón de Referencia (RSE) que contiene -- 10,000 Unidades de Endotoxina P/frasco vial de una endotoxina derivada de E. coli (específicamente la E.C.₅, numeración dada según la evolución del desarrollo de la misma). Además establece que cada proveedor debe referir su Endotoxina Patrón de Control (Control Standar Endotoxin) a aquella y en Unidades de Endotoxina, eliminando la unidad de nanogramos que ya había quedado obsoleta.

Por otra parte, la Industria de Medicamentos conocedora de la magnificencia de la Prueba L.A.L. comenzó a desarrollar su -

propia metodología y cooperar en los avances significativos -- existentes a la fecha. Tal es el caso de algunos Laboratorios Farmacéuticos que implementaron tecnología propia para sus medicamentos y/o aparatos médicos, estableciendo límites de endotoxina permisibles, tamaño de muestra y pruebas de inhibición, hasta incluso, fabricar su propio reactivo.

4.1.3.- SELECCION DEL REACTIVO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS.

El elegir determinada marca comercial distribuidora del reactivo de entre 6 reportadas (Microbiological Associates, -- Difco, Mallinckrodt, Sigma Chem. Copr., Woods Hole, Worthington Biochemical Co.) requirió considerar factores como: especificidad, sensibilidad, estabilidad, costo, dependencia del proveedor, etc.

Especificidad.-- Cada marca comercial prepara el lisado en forma diferente, modificando el procedimiento original de Levin y Bang alteran las propiedades del reactivo: facilidad de manejo, reproducibilidad y estabilidad.

Sensibilidad.-- La mayor diferencia entre marcas de lisados está en el área de sensibilidad, o en la mínima cantidad de endotoxina que puede detectar. Algunas marcas de lisado forman un gel firme en presencia de únicamente 0.04 ng. de Endotoxina por mililitro, pero otras marcas necesitan de por lo menos 0.4 (25).

Finalmente la calidad del gel formado (31), la estabilidad del reactivo después de reconstituido y la Metodología a seguir (gel-no gel, turbidimétrico, espectrofotométrico, etc.) influyeron en la elección.

4.1.4.- GUIA PRACTICA DE PROCEDIMIENTO.

Este procedimiento lo hemos titulado: Manejo y Conservación del Reactivo de Amebocitos de Limulus para Pruebas de Piróge--

nos In-Vitro. Tiene como objetivo describir los pasos a seguir - para fortificar, dosificar, evaluar sensibilidad y, conservación del reactivo. Como información general anotaremos: a).- Cumplir estrictamente con las Buenas Prácticas de Laboratorio, b).- Aplicar criterio al hacer cambios equivalentes para que no afecten - fundamentalmente lo sugerido.

Desarrollo.

a).- Obtención de Agua Bidestilada, con ótimo grado apirogénico.

(Será utilizada para fortificar el reactivo).

- i).- Ensamblar un aparato de destilación de vidrio (capacidad aprox. 2 Lts.) previamente lavado y despirogenizado. (NOTA: El lavado y la despirogenización se pueden eliminar cuando no haya sido utilizado con otros fines).
- ii).- En un matraz Erlenmeyer apirogénico acumular agua recién destilada en cantidad suficiente.
- iii).- Bidestilar, eliminando cabeza y cola del destilado. Adicionar carbón activado 2% v/v.
- iv).- Esterilizar por 30 min., 121°C. y 15 lbs.
- v).- Filtrar por membrana de 0.45 y 0.22 micras. (Equipo Millipore esteril y, matraz kitasato despirog.)
- vi).- Ajustar el pH en un rango de 6 a 7.5.
- vii).- Envasar en frascos de 30 ml. apirogénicos con tapón de neopreno esteril.
- viii).- Esterilizar las piezas con retapa.
- ix).- Conservar en refrigeración. Cada frasco puede usarse, lo más, 4 veces. Deséchese el agua sobrante después de 30 días.

b).- Fortificación del Reactivo liofilizado.

- i).- Reconstituir el frasco vial del liofilizado con el volumen de Agua Destilada libre de pirógenos recomendada por el fabricante:

frasco vial para 10 pruebas adicione 1 ml.

frasco vial para 50 pruebas adicione 5 ml.

Agitar suavemente evitando la formación de espuma. Colocar el vial a temperatura de 2°C. a 8°C. hasta necesitarlo.

- ii).- Dosificar, con exactitud, 0.1 ml. en c/u de los tubos de prueba. Al final de las labores, congelar el reactivo sobrante. (Hielo seco, nitrógeno líquido, etc.).

c).- Verificar la Sensibilidad del Reactivo.

Debe checarsse lote a lote antes de su uso.

- i).- Preparar una serie de diluciones de endotoxina usando Agua Destilada apirogénica como diluyente, a tal concentración que aseguremos sobrepasar la Sensibilidad teórica o de marbete del reactivo en turno.

Para el trabajo experimental que aquí reportamos la Sensibilidad estipulada en marbete fue - - - 0.12 U.E./ml., la confirmamos usando el esquema que a continuación mostramos:

Serie de Endotoxina (U.E./ml.)

<u>0.14</u>	<u>0.12</u>	<u>0.10</u>	<u>0.08</u>	<u>0.06</u>
+	+	-	-	-
+	+	+	-	-
+	+	+	-	-
+	+	+	+	-

Cálculos:

$$\text{Sensibilidad} = \left(\frac{0.12 + 0.10 + 0.10 + 0.08}{4} \right)$$

Sensibilidad experimental = 0.10 U.E./ml.

- ii).- A temperatura ambiente las diluciones de endotoxina pierden actividad en un lapso de 4 Hrs.
- iii).- Control Negativo.

Del diluyente que usa como medio para fortificar el reactivo, tomar una alícuota de 0.1 ml. y dosificarla en un tubo de prueba.

- iv).- Desarrollo de la Prueba.

Homogeneizar las "muestras" por agitación de - - 30 segundos.

Prepare 2 tubos de prueba para cada concentración de la Curva Estándar (endotoxina), Control Negativo y Muestra a ser evaluada, añadiendo 0.1 ml. de cada solución por tubo de prueba. Agite suavemente y colóquelos en baño de agua a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. por 60 min. \pm 1 min. comenzando por una Serie de la Curva Estándar (endotoxina), un Control Negativo, Muestras por duplicado y finalmente cierran el orden otro Control Negativo y la otra Serie de Curva Estándar (endotoxina). Registre la hora en que inicia la incubación. Evite movimientos del agua pues interrumpen la reacción de gelificación en forma irreversible pudiendo reflejar resultados falsos negativos.

Transcurridos 60 minutos, tome uno a uno los tubos de prueba e inviértalos 180 grados con sumo cuidado: aquellos que muestren un gel firmemente adherido a las paredes se consideran como resul-

tados "positivos", los que no gelifican (permanece la fase líquida) o se desprende el gel al momento de la inversión, se registran como "negativos".

v).- Criterios de interpretación de la Prueba.

- 1.- Los tubos que correspondan a la Curva Estándar (serie de endotoxina) al menos de concentraciones más altas probadas, deberán ser positivos. Si todos los tubos son negativos, - la prueba deberá repetirse, lo mismo si todos los tubos son positivos.
- 2.- El tubo de Control Negativo deberá ser negativo. Si muestra algún gel, la prueba deberá repetirse.
- 3.- El tubo conteniendo el Control Positivo deberá ser positivo. Si el resultado es negativo indica la presencia de alguna sustancia que interfiere la reacción y la preparación de - la muestra debe ser evaluada.
- 4.- La sensibilidad del reactivo se determina -- con la Curva Estándar (serie de endotoxina) y no debe ser mayor al valor estipulado en - el marbete. Se calcula promediando la concentración de endotoxina más baja que resultó - positiva en el ensayo.

Ejemplo #1:

Serie de Endotoxina (U.E./ml.)

	<u>0.14</u>	<u>0.12</u>	<u>0.10</u>	<u>0.08</u>	<u>0.06</u>
Réplica #1	+	+	+	+	-
Réplica #2	+	+	+	+	-

$$\text{Sensibilidad} = \frac{0.08 + 0.08}{2} = 0.08 \text{ U.E./ml.}$$

Ejemplo #2:

	<u>Serie de Endotoxina (U.E./ml.)</u>				
	<u>0.12</u>	<u>0.10</u>	<u>0.08</u>	<u>0.06</u>	<u>0.04</u>
Réplica #1	+	+	+	-	-
Réplica #2	+	+	-	-	-

Sensibilidad = $\frac{0.08 + 0.10}{2} = 0.09 \text{ U.E./ml.}$

Nótese que existe continuidad en las lecturas: hacia la izquierda, pruebas positivas; hacia la derecha, pruebas negativas. Si entre ellas se intercala alguna prueba con resultado contrario (+/-) se dice que los resultados son - discontinuos y la prueba deberá repetirse.

4.1.5.- Evaluando la PRECISION del analista.

Preparamos una serie de diluciones de endotoxina (curva estándar) como se describe en el inciso "c" y probamos cada concentración por cuadruplicado.

Estimamos el logaritmo base 10 del punto final de la reacción, en cada serie, donde la concentración más baja de endotoxina fue positiva.

Repetimos el ensayo completo 4 días por separado obteniendo los siguiente valores de Desviación Estándar:

		<u>Series de Endotoxina (U.E./ml.)</u>					
		<u>0.14</u>	<u>0.12</u>	<u>0.10</u>	<u>0.08</u>	<u>0.06</u>	<u>Log₁₀</u>
1er. día	+	+	+	+	-	-	-1.0969
	+	+	+	+	-	-	-1.0969
	+	+	+	+	-	-	-1.0969
	+	+	+	+	-	-	<u>-1.0969</u>
							-4.3876
		D.S. = 0					
2o. día	+	+	-	-	-	-	-0.9208
	+	+	+	-	-	-	-1.0000
	+	+	-	-	-	-	-0.9208
	+	+	-	-	-	-	<u>-0.9208</u>
		D.S. = 0.0396					
3er. día	+	+	+	-	-	-	-1.0000
	+	+	-	-	-	-	-0.9208
	+	-	-	-	-	-	<u>-1.0969</u>
		D.S. = 0.1047					
4o. día	+	+	+	-	-	-	-1.0000
	+	+	-	-	-	-	-0.9208
	+	+	+	-	-	-	-1.0000
	+	+	+	-	-	-	<u>-1.0000</u>
		D.S. = 0.0396					

4.1.6.- RELACION CON LA PRUEBA FARMACOPEICA.

La validez de la Metodología a proponer depende grandemente de la correlación con la Prueba de Pirógenos en conejos. Esto es, si ambas pruebas están midiendo la misma fracción molecular, entónces la relación entre la mínima dosis pirogénica en conejo y la mínima concentración detectable por L.A.L. deben ser regularmente constante.

Esta relación es cuantificable en el Método L.A.L. por medio del reactivo de amebocitos de limulus; y en conejos cuando se trata de la Prueba de Pirógenos hasta ahora Oficial según -- Farmacopea.

Para realizar la Prueba Oficial de Pirógenos se requieren conejos como animales de prueba, adecuadamente alojados en un espacio territorial que comprenda: Area de Cuarentena, Area de Trabajo (cabina donde se efectúen las pruebas), Area de Mantenimiento (donde estarán todos los días), Area de Lavado, Cuarto de Alimento, Cuarto de Equipo y Accesorios, preferencialmente de acero inoxidable. El acabado de pisos, paredes y techos debió ser tal, (superficies lisas, curvas sanitarias, etc.), que facilitaron y aseguraron las labores de sanitización. Las condiciones ambientales fueron también importantes: Iluminación -- 12 horas de luz por otro tanto de obscuridad, Humedad Relativa de 45 a 55%, Temperatura Optima de 20°C. a 22°C., Cambio de Aire (100% no recirculable) de 12 a 15 cambios por hora, ruidos -- evitarlos ya que molestan a los conejos y reflejan la anomalía con comportamientos desconcertantes dada la idiosincracia de este animal (asustadizo). Se ha visto que la colonia se acostumbra a ser trabajada durante un cierto lapso del día y a recibir alimento y agua en horas fijas. El manejo fue cuidadoso y sistemático por parte de Personal Técnico entrenado (32).

Se complementó la cepa de conejos New Zelanda, ajustando la edad de la colonia a un promedio de 2 a 3 años de vida con nuevas adquisiciones: recién destetados, de la misma camada, -- con un peso de 1.200 a 1.500 Kgs.; estas características nos permitieron trabajar con ellos durante 50 días en una primera etapa llamada de Selección/Cuarentena. Al llegar de la granja abastecedora se revisó el estado físico (que no estén laceradas sus orejas, que no presenten secreción lacrimal, región perianal libre de excremento, no protuberancias en el cuerpo, que la superficie de las plantas de las patas no muestren ulceraciones o llagas, etc.) y se tomó muestra para análisis coproparasitoscópico.(33). Se continuó en los subsiguientes días con la desparasitación externa e interna, nuevamente se tomó muestra para análisis coproparasitoscópico y, si los resultados eran satisfactorios, podían utilizar el Area de Pruebas para ser entrenados -- gradualmente a permanecer en los cepos y soportar el estímulo o adaptación a la sonda-termopar. A continuación se verificó el estado que guarda su sistema térmico regulador a base de adaptación al estímulo causado por la inyección de solución salina -- isotónica estéril y monitoreo de sus temperaturas corporales, -- aquellos que mostraban un incremento no mayor a 0.5°C . podían ser sensibilizados con una solución de endotoxina con 50 nanogramos por mililitro. Si el incremento de temperatura es mayor a 0.6°C . descansan 14 días y se aprovecha el receso para tatuar una oreja con el número progresivo que se le desee asignar, al término de este período se vuelven a someter a prueba con un blanco negativo; si pasan la prueba se les cortan las uñas y -- trasladan al Area de Mantenimiento para su uso en pruebas de rutina. Fig.#3. Su comportamiento clínico mostrado (Ver Fig. #4) en el transcurso de los 50 días de Selección/Cuarentena, aunado

**LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD
BIOTERIO
CONEJOS EN CUARENTENA**

No. de Cuarentena _____			Conejo No. _____	
Día	Fecha	Peso	Etapas	Observaciones
0				
1			Desp. Externa	
2			Desp. Externa	
3			Desp. Externa	
4			Desp. Interna	
5			Desp. Interna	
6			Desp. Interna	
7			Desp. Interna	
8			Desp. Interna	
9			Cooperant	
10			Coop	
11			Coop	
12			Coop	
13			Coop	
14			Corte Uñas	
15				
16			Adap. Coop 1 ^a	
17			Adap. Coop 2 ^a	
18			Adap. Coop 3 ^a	
19			Adap. Coop 4 ^a	
20			Adap. Temporar 1 ^a Temp. Reg.	
21			Adap. Temporar 2 ^a Temp. Reg.	
22			Adap. Temporar 3 ^a Temp. Reg.	
23			Adap. Temporar 4 ^a Temp. Reg.	
24			Pba. de Esp. Isocénica Temp. Reg.	
25				
26				
27			Pba. Sin Alimentación Inc. Max. de Temp.	
28-42			Tarce	
			1 ^a Pba. Exp. c/ Sol Sa. Isl. Est. Inc. c/ 08	
50			2 ^a Pba. Exp. c/ Sol Saludón	
			Aceptación	
			Eliminación	

Fig. # 4.- (Anverso). Registro de Comportamiento Clínico que se sugiere para el Control de conejos en etapa de Selección/Cuarentena.

a los reportes médicos, integran el historial clínico de cada conejo (Fig. #5) que apoyará la decisión al darlos de baja, tomando en cuenta también los resultados de una inspección física rigurosa antes de decidir si continúa o es retirado.

4.1.7.- ANALISIS IN-VIVO/IN-VITRO DE UNA ENDOTOXINA DE CONTROL.

Preparada la colonia de conejos que corroborarían las observaciones del Método in-vitro (L.A.L.) se requería un factor determinante que actuase en ambas pruebas (in-vivo/in-vitro) y nos diese una respuesta cuantificable utilizando una Endotoxina de Control.

La Farmacopea de los Estados Unidos (U.S.P.) sugiere utilizar endotoxina aprobada y validada por la F.D.A. o bien una Endotoxina de Control (CSE). (34)

En este trabajo se usó un Estándar de Control (CSE) a base de E. coli 0127B:8.

La respuesta en ambos Métodos (in-vitro/in-vivo) se logró preparando una solución de endotoxina de concentración conocida.

Con las precauciones y medidas de seguridad posibles (ya que se desconocen los efectos de la inhalación de la endotoxina) se pesan 5.00 mg. de E. coli 0127B:8 liofilizado, en un papel aluminio despirogenizado y con la ayuda de una espátula en las mismas condiciones. Se disolvieron en 500 ml. de Agua Destilada libre de pirógenos, con agitación continua y, finalmente se afioró a 1,000 ml. para tener una concentración de 5,000 ng./ml. ó 50,000 U.E./ml. según la E.C.₅ Estándar de Endotoxina de Referencia propuesto por la F.D.A.

Esta preparación se hizo por cuadruplicado y se tomaron - 4 alícuotas de 250 ml. c/u para obtener 1,000 ml. de solución homogénea de endotoxina de control. Se envasa en frascos via- les numerados de 20 ml. y se valora in-vitro. Su conservación es en refrigeración entre 2 y 8°C.

Para verificar la concentración y homogeneidad de la solu- ción recién preparada hicimos un muestreo reducido $\sqrt{n+1}$ de frascos contenedores seleccionando 7 de ellos según Tabla de - Números Aleatorios y determinamos su concentración por dilucio- nes seriadas según esquema que se muestra junto con resultados:

	Muestra s/diluir	<u>F a c t o r d e d i l u c i ó n</u>				
		1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Fcos. #10,	+	+	+	+	-	-
34 y 9	+	+	+	+	+	-

Concentración = (Factor dilución)(Sensibilidad)

$$\text{Conc. U.E./ml.} = \left(\frac{256 + 512}{2} \right) (0.12 \text{ U.E./ml.}) = 46.08$$

Fcos. #10, 34 y 9

Fcos. #25,	+	+	+	+	+	-
33, 1 y 35.	+	+	+	+	-	-

$$\text{Conc. U.E./ml.} = \left(\frac{256 + 512}{2} \right) (0.12 \frac{\text{U.E.}}{\text{ml.}}) = 46.08$$

Fcos. #25, 33, 1 y 35

LA SOLUCION DE ENDOTOXINA DE CONCENTRACION CONOCIDA - -
 (50,000 U.E./ML.) SE INYECTO AL CONEJO EN DOSIS GRADUALES Y SI-
 MULTANEAMENTE SE CUANTIFICO IN VITRO SU CONCENTRACION, A FIN DE
 MOSTRAR LA SENSIBILIDAD DE LOS METODOS Y LA ESPECIFICIDAD DE LA
 ENDOTOXINA USADA COMO FACTOR COMUN.

I N - V I T R O		I N - V I V O		
L.A.L.		CONEJO		
Conc. teórica U.E./ml.	Conc. Experim. U.E./ml.	Increment.temp. por conejo en grados C.	Promedio Increment.temp. en grados C.	Porciento conejos pirogénic.
0.010	0.00	0.2, 0.1, 0.2	0.2	0%
0.101	0.12	- - -	-	-
	0.12	- - -	-	-
0.202	0.24	- - -	-	-
0.506	0.72	- - -	-	-
0.910	0.96	- - -	-	-
1.012	0.96	0.3, 0.00, 0.00	0.1	0%
	--	0.1, 0.6, 0.2		
		0.2, 0.4, 0.4		
		0.7, 0.5	0.4	25%
1.518	0.96	- - -	-	-
2.020	--	0.6, 0.9, 0.2	0.6	67%
2.220	1.92	- - -	-	-
5.060	7.68	1.0, 1.1, 0.6	0.9	100%
	--	1.0, 0.1, 1.2	0.8	67%
	2.88	0.6, 0.4, 0.7	0.6	67%
9.100	--	0.3, 0.6, 0.7	0.5	67%
10.012	7.68	0.4, 0.9, 0.6	0.6	67%
15.180	--	1.2, 1.3, 0.4	1.0	67%
22.200	--	0.9, 0.8, 1.2	1.0	67%
25.000	--	0.6, 0.7, 0.6	0.6	100%
	--	0.9, 0.6, 0.9	0.8	100%
50.060	--	0.8, 1.3, 1.4	1.2	100%
	15.36	1.5, 1.4, 1.6	1.5	100%
	61.44	1.1, 1.2	1.1	100%
	61.44	1.4, 1.6, 0.8	1.3	100%
101.200	92.16	1.3, 1.5, 1.0	1.3	100%
	--	1.0, 1.3, 1.0	1.1	100%

4.1.8.- ESTUDIO DE LA RED DE AGUA.

En esta etapa de nuestro trabajo experimental consideramos importante examinar de cerca un proceso representativo y los servicios que en él intervienen para ejemplificar la utilidad de una Prueba de Pirógenos alterna a la Oficial.

Tomamos en cuenta elementos universales de todo proceso como: el Agua, Calidad de la Materia Prima, Contenedores Primarios, Servicios, Producto en Granel y Producto Final.

El Agua y sus procesos alternos de purificación y distribución conformaron una buena parte de nuestras observaciones. El Agua que entra a una Planta Farmacéutica proviene de la Red Municipal. Se almacena en cisternas donde se clorina y de allí se bombea a un tanque elevado para mejorar su presión de caída.

Esta agua pasa por un Sistema de Purificación, primero por Carbón activado para quitarle los olores y Cloro residual. Pasa al Sistema de Intercambio catiónico/aniónico, después al Sistema de Lecho Mixto; por este sistema de purificación se obtiene el Agua Deionizada útil en las Areas para el lavado de equipo, material y productos no estériles. El agua al salir del Sistema de Intercambio Iónico es conducida a través de tubería de acero inoxidable, debe almacenarse en tanques de acero inoxidable con atmósfera de Nitrógeno, inerte, de capacidad adecuada. El agua está en continua recirculación por la red y, durante las noches, se calienta a 85°C. para evitar la proliferación de microorganismos, ya que el agua en estas condiciones no debe contener ningún agente conservador. Se recomienda utilizar filtros de 10, 5 y 2.5 micras en sitios estratégicos de la red y finalmente otro de 0.22 micras en la toma de uso. Todos ellos verificados y cambiados periódicamente. El agua purificada sirve de base para la obtención de Agua Destilada (Fig. #6) y vapor limpio.

El estudio de la contribución pirogénica de la Red de -- Agua se hizo por medio de muestreos selectivos reforzados con Pruebas Físicas y Biológicas de rutina que nos permitieron -- identificar posteriormente los puntos críticos o representativos para su monitoreo.

Cada muestra fue diluida en serie 1:1 con Agua apirogénica para estimar inicialmente la concentración de endotoxina en cada punto y fijar el factor de dilución donde daba positiva la Prueba L.A.L.- Este barrido dio los siguientes factores de dilución:

	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>16</u>	<u>32</u>	<u>64</u>	<u>128</u>
Agua Municipal	+	+	+	+	+	+	+	+
Entrada Sistema Carbón Activado	+	+	+	+	+			
Salida Sistema Carbón activado	+	+	+	+				
Salida Sistema Lecho Mixto	+	+	+					
Salida Tanque de Distribución.	+	+						
Salida de Filtros	+							
Entrada máquina Lavadora ampolletas	+							
Salida Destilador	-							
Tomas Area Estéril	-							

Las características químicas del reactivo que pueden reflejarse en resultados falso-positivos (ya que gelifica en -- presencia de sustancias químicas, o bien requiere un ajuste de pH previo al análisis) redujo el esquema de muestreo a solamente "puntos"críticos" de características físico-químicas compatibles con el reactivo. Así eliminamos Muestras como --

Agua Municipal, Sistemas catiónico y aniónico cuyos resultados no serían consistentes por interferencia con L.A.L.

Establecidos los Puntos de Muestreo, como se puede observar en el diagrama adjunto (Fig. #6), se llegó a la conclusión de hacer el monitoreo 10 días seguidos, para ir siguiendo de cerca el aumento o disminución de la pirogenicidad conforme pasan los días. Para su análisis se utilizaron frascos viales y matraces avirogénicos, guantes, estériles, etc. y se tomaron las debidas precauciones asépticas para lograr una muestra representativa y confiable. Las muestras se trataron individualmente por medio del reactivo L.A.L. y, si era necesario, se hacían diluciones seriadas estimando la concentración de endotoxina con la expresión:

$$\text{Conc. en U.E./ml.} = (\text{Factor Dilución})(\text{Sensib.LAL})$$

donde la Sensibilidad del reactivo fue un valor fijo, previamente calculado, igual a 0.12 U.E./ml.

Los resultados experimentales que se obtuvieron son el promedio de 10 mediciones reportadas individualmente en Unidades de Endotoxina por mililitro.

Salida Sistema Carbón activado	0.48
Salida Sistema Lecho Mixto	0.48
Salida Tanque de Distribución	0.24
Salida de los Filtros	0.12
Toma Agua Deioniz. en Area Estéril	0.12
Toma de Agua Destil. en Area Estéril	< 0.12

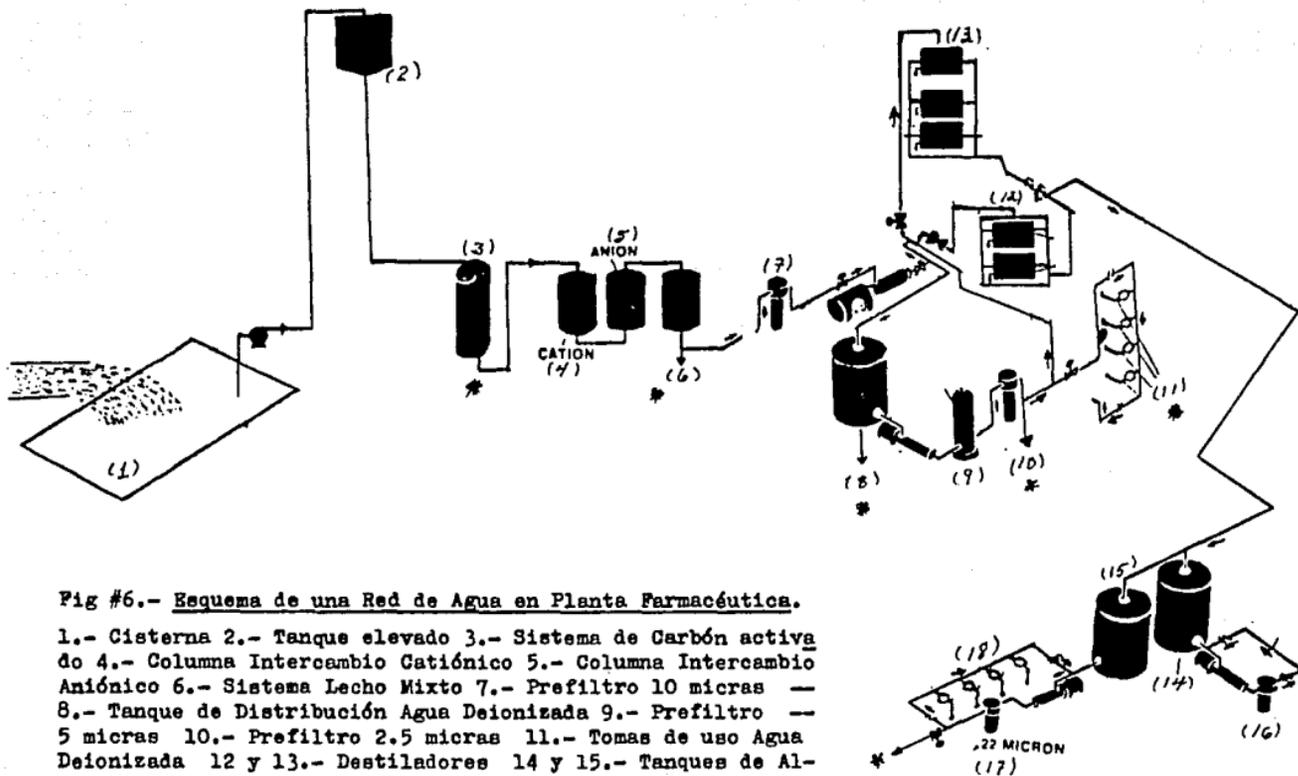


Fig #6.- Esquema de una Red de Agua en Planta Farmacéutica.

- 1.- Cisterna 2.- Tanque elevado 3.- Sistema de Carbón activo
 4.- Columna Intercambio Catiónico 5.- Columna Intercambio Aniónico 6.- Sistema Lecho Mixto 7.- Prefiltro 10 micras
 8.- Tanque de Distribución Agua Deionizada 9.- Prefiltro 5 micras 10.- Prefiltro 2.5 micras 11.- Tomas de uso Agua Deionizada 12 y 13.- Destiladores 14 y 15.- Tanques de Almacenamiento 16.- Filtro 0.22 micras 17.- Filtro 0.22 micras 18.- Tomas de uso.

* = Puntos de Muestra

Si bien los Métodos microbiológicos tradicionales para el análisis del Agua (Filtración por membrana, Número más Probable, Cuenta Total Microorganismos aerobios, etc.) a la fecha siguen mostrando su eficiencia y contribuyen significativamente en la calidad del agua y, por ende, en un producto farmacéutico, la propiedad del lisado de amebocitos de *Limulus* de gelificar cuando está en contacto con alguna endotoxina o agente pirogénico — fue evaluada analizando en paralelo 17 muestras de Agua por duplicado, entrada y salida del Sistema de Carbón Activado como parte del seguimiento al Proceso de Mantenimiento dado periódicamente al Sistema. En cada evento la liberación parcial o total del Sistema fue hecha en base a los resultados microbiológicos que se muestran en la Tabla #2. La información así concentrada indica una ligera relación entre la eficiencia del mantenimiento al Sistema de Carbón activado y la metodología L.A.L., es posible que validando ésta última forme parte de los Controles de un proceso validado. Esta hipótesis se fundamenta en la gráfica anexa (Fig. #7) donde representamos una parte del proceso de purificación del agua, básicamente la transformación de Agua Potable a Agua Deionizada que fue monitoreada durante 17 días en 13 muestras tomadas una a una en base diaria.

ENTRADA Salida T.G.F./
Distrib.

	10/100	250/100	400/100	600/100	800/100	1000/100	1200/100	1500/100	2000/100	3000/100	4000/100	5000/100	6000/100	7000/100	8000/100	9000/100	10000/100
5			14.0					9.0									1.8
6			14.0					7.0									3.5
10			3.5					19.0									1.8
11			3.5					7.0									1.8
13			14.0					7.0									7.0
17	0	0	0	61.4	0	0	Inc	61.4	0	0	44	61.4					
18	0	0	0	61.4	0	0	1222	61.4	0	0	52	30.7					
19	0	0	0	30.7	0	0	0	30.7	0	0	8	15.4					
20	0	0	0	30.7	0	0	0	30.7	0	0	307	15.4					
21	0	0	0	15.4	0	0	0	30.7	0	0	11	15.4					
24	0	0	0	30.7	0	0	1	15.4	3	0	34	30.7					
25	0	0	0	15.4	0	0	2	7.7	0	0	22	15.4					
26	0	0	0	30.7	0	0	0	15.4	0	0	71	15.4					
27	0	0	0	15.4	0	0	11	15.4	6	3	98	15.4					
31	0	0	0	7.7	0	0	5	3.5	0	0	44	3.5					
12	0	0	0	7.7	0	0	9	3.5	0	0	117	7.7					
3	0	0	0	3.5	0	0	99	7.7	0	1	20	3.5					
10	0	0	0	514.1	0	0	17	514.1	0	8	29	514.1					
14	0	0	0	3.5	0	0	33	51.4	0	0	12	51.4					
15	0	0	1	0.4	0	0	56	0.4	0	0	100	0.4					
16	0	0	0	20.9	0	0	7	20.9	0	0	0	0.2					
17	0	0	1	3.5	0	0	87	1.8	0	0	Inc	20.7					

Tabla # 2.- Cuadro comparativo que indica la posible relación entre la biocarga y la concentración pirogénica

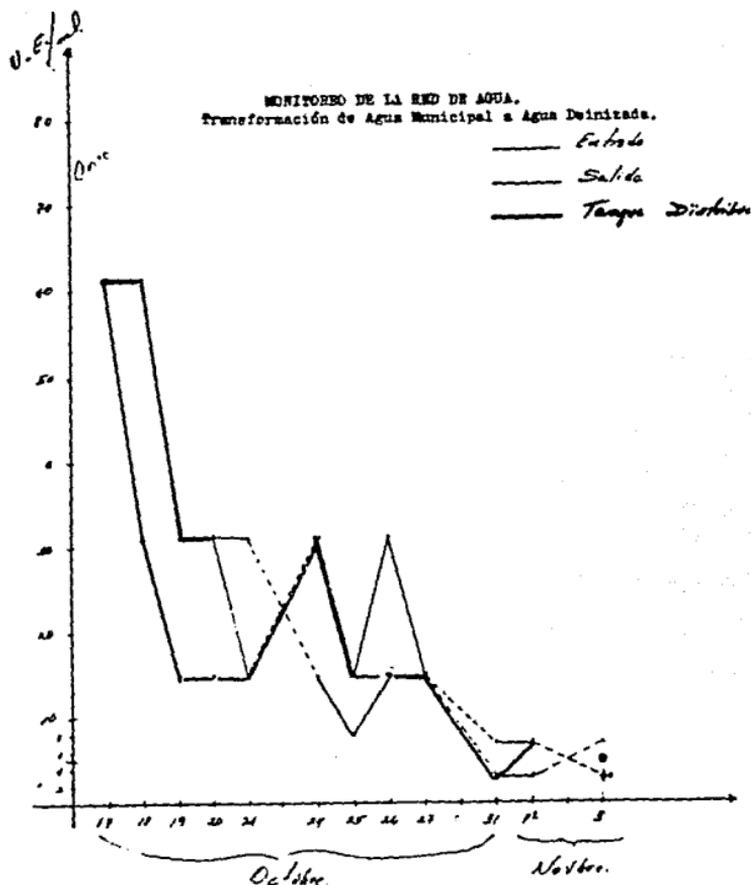


Fig. #7.- Representación gráfica de la calidad pirogénica del Agua en la Red durante la transformación de Agua Municipal a Agua Deionizada, evidenciando la utilidad de la Prueba LAL como un Control en Proceso que auxilie a los Programas de Mantenimiento (preventivos o correctivos) de la red general de Agua.

4.1.9.- CUANTIFICACION DE ENDOTOXINA EN AGUA DESTIILADA PARA USO EN FABRICACION.

1).- Muestreo.

Se reciben periódicamente las muestras por duplicado - en matraces Erlenmeyer apirogénicos con 200 ml. c/u.

ii).- Preparación de un Control Positivo.

Debe hacerse en cada corrimiento de la prueba, a partir de una solución de endotoxina de concentración conocida cuya dilución final tenga una concentración no mayor al doble de la sensibilidad del reactivo L.A.L. en uso. Ejm.: Si el reactivo reporta una sensibilidad de 0.12 U.E./ml. en marbete, el Control Positivo puede prepararse a 0.20 U.E./ml.

iii).- Procedimiento de Prueba.

Como se describe anteriormente. Pág. 51

iv).- Criterios de Interpretación de la Prueba.

Los indicados en la Pág. 53

Si el resultado de alguna muestra es negativo y el Control Positivo presenta gelificación (resultado positivo), interpretamos que la concentración de la muestra es menor a la sensibilidad del lote de reactivo L.A.L. usado. Si alguna muestra es positiva, se hacen diluciones seriadas 1:1 de la muestra original y se prueban por duplicado. La concentración de endotoxina para esa prueba se calcula multiplicando la Sensibilidad experimental del reactivo por el factor de dilución (F) que está representado por la media aritmética del inverso de las diluciones más altas con (gelificación) resultado positivo.

Conc. de endotoxina = (F) (Sensibilidad del reactivo)
(U.E./ml.) en U.E./ml.

Se corrieron en paralelo 16 muestras de Agua Destilada para uso en Fabricación obteniéndose los siguientes resultados con los Criterios de Aceptación y Rechazo que se indican para cada Método:

IN-VITRO.- Gel o No Gel.- Prueba positiva, presencia de gel, indica de pirogenicidad.- Se rechaza.

Prueba negativa, ausencia de gel, muestra no pirogénica. Se acepta.

IN-VIVO.- Prueba Positiva. Muestra pirogénica, la suma de los incrementos de temperatura es mayor a 1.4°C. o bien algún conejo muestra un incremento mayor o igual a 0.6°C., se Rechaza.

Prueba Negativa. Muestra no pirogénica, la suma de los incrementos de temperatura es menor a 1.4°C. y ningún conejo muestra un incremento mayor o igual a 0.6°C., se Acepta.(36)

	IN -- VITRO		IN - VIVO	
	Acepta	Rechaza	Acepta	Rechaza
1.-		_____		
2.-		_____		
3.-		_____		
4.-		_____		
5.-		_____		
6.-		_____		
7.-		_____		
8.-	_____			
9.-		_____		
10.-	_____			
11.-		_____		
12.-		_____		
13.-		_____		
14.-		_____		
15.-		_____		
16.-		_____		

n = 16 ; 100%

Eventos deseables	(1,2,3,4,6,7,8,9,12 y 16)	= 10	62.5%
Eventos NO deseables	(10)	= 1	6.2
Eventos NO deseables, pero justificables	(5, 11, 13, 14 y 15)	= 5	31.3%
			100.0

62.5 + 31.3 = 93.8% reproducibilidad

4.1.10.- DETECCION DE ENDOTOXINA EN MATERIA PRIMA. (LINCOMICINA)

Para evidenciar la presencia de pirógenos en la materia prima se hicieron los siguientes razonamientos:

Qué cantidad de muestra someteríamos a prueba?. La bibliografía reporta que la dosis de prueba en conejo (0.5 mg./kg.) - (Ref.35) fue reducida 20 veces para eliminar el efecto tóxico del antibiótico. Esto es, si en realidad la dosis humana está reportada como 10 mg./Kg. peso corporal, probamos a 20, 10 y 5 mg. de base por mililitro.

Preparamos una soluciones de Lincomicina considerando una potencia teórica de 800 mcg./mg., se usó Agua Destilada como medio de disolución.

Verificamos y ajustamos pH a 7.0 ± 0.2 con solución de Hidróxido de Sodio 1 N. o Solución de Acido Clorhídrico 1 N. Tabla 3.

Probamos que el reactivo (Lisado de Amebocitos de Limulus) fuera compatible con el antibiótico; entendiéndose por compatibilidad que el reactivo no fuese inhibido o potencializado al estar frente a Lincomicina pirogénica a concentración fija como antibiótico y, variable el grado pirogénico.

Se pesaron por quintuplicado 1,240 mg. de Clorhidrato de Lincomicina y se disolvió cada muestra aforando a 50 ml. con Agua pirogénica a 5 diferentes concentraciones: 0.5, 0.25, 0.12, 0.06 y 0.03 U.E./ml. Para conseguir diluciones finales por quintuplicado a 20 mg./ml., 10 y 5 mg./ml. se hicieron dos diluciones seriadas en proporción 1:2. Cada muestra (15 en total) se hizo reaccionar frente al reactivo L.A.L. por duplicado. Además de 5 muestras de Agua pirogénica a otras tantas concentraciones y 1 muestra del Agua Destilada (usada como diluyente) para Control Negativo.

	Concentración (mg./ml.)		
	<u>5.00</u>	<u>10.00</u>	<u>20.00</u>
Materia Prima (Lincomicina)	4.73	5.06	4.76
Granel. (Soluc. de Linco micina)	5.02	5.01	4.77

Tabla #3.- Estudio de pH en Materia Prima y Producto. Utilizándose 10 Lotes para su determinación promedio.

Al final de la reacción, tanto la endotoxina de la Lincomicina como la endotoxina del Agua (medio de dilución) sirvieron para:

a).- Determinar la concentración de prueba para el antibiótico en estudio.

b).- Comprobar que a esa concentración práctica no existe interferencia química alguna que modifique el resultado. Tomando como no interferencia cuando el punto final de la reacción (gelificación) de la endotoxina en Lincomicina era idéntico al de la endotoxina en Agua.

Resultados:

Tabla #4

Concentración de Endotoxina añadida
en U.E./ml.

	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03
Lincomicina 20 $\frac{\text{mg.}}{\text{ml.}}$	†	†	=	=	=
Lincomicina 10 $\frac{\text{mg.}}{\text{ml.}}$	†	†	†	=	=
Lincomicina 5 $\frac{\text{mg.}}{\text{ml.}}$	†	†	†	†	=
Agua Destilada +	+	+	+	+	-
Endotoxina	+	+	+	-	-
Agua Destilada	=				

Esto indica que a mayor concentración de antibiótico es más probable que exista inhibición, razón por la cual deducimos que la Concentración de Prueba fuera 5 mg./ml. aproximadamente.

Fue necesario fijar la preparación de un Control Positivo que indique la habilidad y respuesta del reactivo frente a condiciones preestablecidas. De acuerdo a la Tabla anterior es recomendable 0.5 U.E./5 mg./ml.

Se analizaron 15 lotes de Lincomicina para evaluar su contribución pirogénica al proceso bajo el siguiente procedimiento:

- 1.- Pesar 310 mg. de Lincomicina Clorhidrato.
- 2.- Disolver en Agua Destilada libre de pirógenos.
- 3.- Aforar a 50 ml. y homogeneizar perfectamente.
- 4.- Ajustar pH con Hidróxido de Sodio 1 N. a un rango de 6 a 7.5.
- 5.- Dosificar en tubos de reacción, alícuotas de 0.1 ml.
- 6.- Preparar Control Negativo dosificando en tubos de reacción, 0.1 ml. de Agua Destilada Libre de pirógenos, usada en la disolución de la muestra.
- 7.- Preparar un Control Positivo.- Se selección un Lote de Clorhidrato de Lincomicina con características físico-químicas y microbiológicas probadas; pesar 310 mg. y disolver en Agua pirogénica conteniendo 0.5 U.E./ml. Homogeneizar. Tomar 2 alícuotas de 0.1 ml. y dosificar en tubos de reacción.
- 8.- Adicionar 0.1 ml. de reactivo L.A.L. a cada tubo de reacción, agitar suavemente, incubar a $37^{\circ}\text{C.} \pm 1^{\circ}\text{C.}$ por 60 min., verificar la formación de un gel sólido indica prueba (+); ausencia de gel firme, prueba (-).

Los resultados obtenidos tanto por la Prueba USP como por la Prueba L.A.L. fueron los siguientes:

	<u>U.S.P.</u>	<u>L.A.L.</u>
Control Positivo	No virogénico	Pirogénico
Control Negativo	No pirogénico	No virogénico
Lote 1A	No pirogénico	No pirogénico
Lote 2B	No pirogénico	No pirogénico
Lote 3C	No pirogénico	No virogénico
Lote 4D	No pirogénico	No pirogénico
Lote 5E	No pirogénico	No pirogénico
Lote 6F	No virogénico	No virogénico
Lote 7G	No pirogénico	No pirogénico
Lote 8H	No pirogénico	No pirogénico
Lote 9I	No pirogénico	No pirogénico
Lote 10J	No pirogénico	No pirogénico
Lote 11K	No pirogénico	No pirogénico
Lote 12L	No pirogénico	No pirogénico
Lote 13M	No pirogénico	No pirogénico
Lote 14O	No pirogénico	No pirogénico
Lote 15P	No pirogénico	No pirogénico
Control Negativo	No pirogénico	No pirogénico
Control Positivo	No virogénico	Pirogénico

4.1.11.- DETECCION DE ENDOTOXINA A PRODUCTO EN PROCESO.

La aplicación de esta prueba (L.A.L.) en proceso es voco es timada a la fecha, sólo en casos donde existe el factor costo/— tiempo para decidir la continuidad o suspensión de un proceso in terrumpido, puede rendir utilidad a posteriori.

La finalidad de estas anotaciones es mostrar que cuando se cuenta con un Control de Calidad exhaustivo en puntos estratégicos del proceso de manufactura, la contribución pirogénica es mí nima. Además intentamos que sean observaciones preliminares enca minadas a conformar una Metodología, previendo el futuro de esta prueba in-vitro.

Se estudió la formulación del producto determinando la contribución porcentual aproximada de la materia prima y excipientes más importantes; Concentración 300 mg./ml., Lincomicina 30%, Alcohol Bencílico menor a 1% y Agua Destilada para Inyección 69%.

Encontramos que la única variante con respecto a una simple solución de Clorhidrato de Lincomicina, es el Alcohol Bencílico cuya contribución no es inhibitoria según reporte de J.F. Cooper y Susan M. Pearson quienes establecieron que sólo una concentración mayor a 1% sí modificaba la reacción endotoxina-L.A.L.

Probamos que el Producto "A" deliberadamente contaminado — con concentraciones conocidas de endotoxina promovía la formación de un gel firme y sólido. Consideramos la concentración del principio activo en solución (300 mg./ml.) y tomamos alícuota de 1.7 mililitros por quintuplicado, cada alícuota se diluyó a 50 ml. — con Agua Pirogénica a 5 diferentes concentraciones (0.5, 0.25, — 0.12, 0.06 y 0.03 U.E./ml.) De cada dilución inicial se hicieron 2 diluciones seriadas en proporción 1:2 para lograr concentraciones de prueba iguales a 10 mg./ml., 5 y 2.5 mg./ml. Se integró —

un Control Positivo (Agua pirogénica) y un Control Negativo -- (Agua destilada apirogénica).

Siguiendo el criterio de no inhibición cuando el punto final de la reacción (gelificación) de la endotoxina en Agua, se adicionó 0.1 ml. del reactivo a 0.1 ml. de cada muestra y se incubó a temperatura y tiempo pre-establecidos.

Resultados:

Tabla #5

	Concentración de Endotoxina añadida, en U.E./ml.				
	<u>0.50</u>	<u>0.25</u>	<u>0.12</u>	<u>0.06</u>	<u>0.03</u>
10 mg./ml.	†	†	=	=	=
5 mg./ml.	†	†	†	=	=
2.5 mg./ml.	†	†	†	†	=
Agua pirogén.	†	†	†	†	
Agua apirogén.	=				

Confirma que relativamente a menores concentraciones reacciona mejor la endotoxina de la Lincomicina con el Lisado de Amebocitos de Limulus. Por razones prácticas establecimos la Concentración de Prueba como 3 mg./ml., incrementándose 60 veces -- con respecto a la Concentración de Prueba en Conejo 0.5 mg./Kg.

Las condiciones requeridas para un Control Positivo que -- asegure la habilidad y respuesta del reactivo son: 3 mg./ml. y concentración pirogénica igual a 0.5 U.E./ml. tomando en cuenta el Umbral de Dosis Pirogénica (TPD) igual a 10 U.E. referidas a la R.S.E. E.C.₅ según U.S.P. XXI y N.F.XVI tenemos que la relación TPD por Dosis Humana es:

$$5 \text{ U.E./10 } \frac{\text{mg. Lincomicina}}{\text{Kgs.}} = 0.5 \text{ U.E./dosis}$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Analizamos 5 lotes de Producto "A" en Granel bajo el siguiente procedimiento:

- 1.- Tomar una alícuota de 1 ml. y diluirla a 100 ml. con Agua Destilada libre de pirógenos.
- 2.- Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 y mezclar adecuadamente.
- 3.- Dosificar en tubos de reacción, alícuotas de 0.1 ml.
- 4.- Preparar Control Negativo dosificando en tubos de reacción, 0.1 ml. de Agua Destilada libre de pirógenos, usada en la disolución de la muestra.
- 5.- Preparar un Control Positivo a base de 1 ml. del Producto "A" y diluirlo a 100 ml. con Agua Destilada conteniendo 0.5 U.E./ml.
- 6.- Adicionar 0.1 ml. de reactivo L.A.L. a cada tubo de reacción, agitar suavemente, incubar a $37^{\circ}\text{C.} \pm 1^{\circ}\text{C.}$ por 60 min., verificar la formación de un gel sólido indica prueba (+); ausencia de gel firme, prueba (-).

Los resultados obtenidos tanto por la Prueba USP como por la Prueba L.A.L. fueron:

	<u>USP</u>	<u>LAL</u>
Control Positivo	No pirogénico	Pirogénico
Control Negativo	No pirogénico	No pirogénico
Lote 1	No pirogénico	No pirogénico
Lote 2	No pirogénico	No pirogénico
Lote 3	No pirogénico	No pirogénico
Lote 4	No pirogénico	No pirogénico
Lote 5	No pirogénico	No pirogénico
Control Negativo	No pirogénico	No pirogénico
Control Positivo	No pirogénico	Pirogénico

4.1.12.- DETECCION DE ENDOTOXINA EN VAPOR LIMPIO.

El vapor limpio es uno de los servicios con que se cuenta

en la Industria Farmacéutica, éste se genera a partir de Agua - deionizada, en la cual el Agua es calentada hasta la fase vapor y en esta forma se envía a través de tubería de acero inoxidable a las Areas Estériles; los puntos donde se localiza son -- Cuartos de Lavado de material, autoclaves, lavadoras de frasco y ampolletas. Adicionalmente el uso de este servicio mejora las condiciones de limpieza del equipo eliminando o disminuyendo la biocarga microbiana por lo que también se le utiliza para esterilizar tuberías de acero inoxidable que transportan el Agua de ionizada y destilada.

El monitoreo del Vapor limpio por medio del reactivo L.A.L. verifica que éste llegue en condiciones apirogénicas en los puntos de uso.

Para la toma de muestra se utilizó el siguiente material:

- Matraces Erlenmeyer apirogénicos.
- Condensador de vapor.
- Reactivo L.A.L.

Procedimiento:

Se usa equipo de protección adecuado. El vapor limpio se hace pasar por el condensador obteniéndose así Agua de Condensación. La muestra fue recolectada en material apirogénico y se hace reaccionar con la solución de L.A.L. siguiendo la Técnica ya descrita en la Pág.52, obteniéndose los siguientes resultados:

<u>Punto de Muestreo</u>	<u>Concentración estimada</u>
Autoclave 1	Menor 0.12 U.E./ml.
Autoclave 2	Menor 0.12 U.E./ml.
Cuarto de Lavado	Menor 0.12 U.E./ml.
Lavadora de frasco	Menor 0.12 U.E./ml.

Durante 5 días alternos se repitió el seguimiento con los mismos resultados tenidos el primer día.

4.1.13.- DETECCION DE ENDOTOXINA EN VIALES Y AMPOLLETAS.

El calor seco es uno de los métodos más comunes para esterilizar y/o despirogenizar el equipo y los contenedores primarios que se emplean en la fabricación de productos estériles.

Durante la proyección de la Prueba L.A.L. se validó el horno del Laboratorio para asegurar su capacidad de despirogenización y estudiar la reproducibilidad de los resultados. El estudio se basó en los términos que maneja la U.S.P., donde los parámetros críticos a controlar son el tiempo de exposición y la temperatura de esterilización.

El primer paso fue observar la distribución de calor para lo cual se utilizaron termopares tipo J, éstos se colocaron en forma geométrica en toda la cámara del horno, ver. Fig. #8. La temperatura del horno se fijó a 200°C. y se monitoreó 2 Hrs. auxiliándonos con un Registrador Speedomax; con los datos obtenidos se determinó el valor de F_H en el punto más frío, los cálculos se muestran en la Tabla #6.

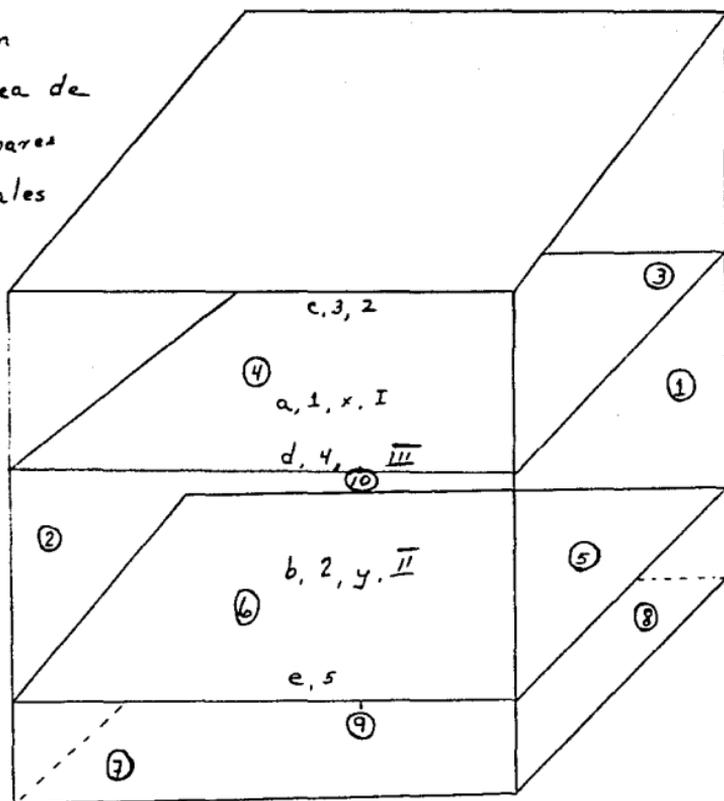
La segunda etapa consistió en preparar viales con endotoxina de concentración conocida, mismos que identificamos y distribuimos en forma geométrica en la cámara del horno durante el Ciclo de Esterilización, 2 Hrs. a 200°C.

Técnica:

- 1.- Prepare una solución de endotoxina que contenga - - - 500,000 U.E. por mililitro.- Llamaremos Solución "A".
- 2.- Coloque la solución de endotoxina en un baño de ultrasonido por 10 min. y agítela 5 min. antes de la inoculación.
- 3.- Inocule los viales (previamente despirogenizados en -- horno 1 Hr. a 250°C.) colocando la alícuota en el fondo del vial:
 - a).- 0.1 ml. de la Solución "A" en 5 frascos viales para -

Fig. #8.-

Diagrama
Distribución
Geométrica de
los Termopares
y Fcos. viales



o termopar

Núm. de termopar	Tiempo (min.)	Temp. °C.	L.R.	F.H.
4	0	23	0.000	00.00
4	20	50	3.160×10^{-8}	6.00×10^{-7}
4	40	96	6.300×10^{-6}	1.20×10^{-4}
4	60	110	3.160×10^{-5}	6.30×10^{-4}
4	80	150	3.160×10^{-3}	0.06
4	100	180	0.100	2.00
4	120	200	0.891	17.80
4	140	200	0.891	17.80
4	160	200	0.891	17.80
4	180	200	0.891	17.8
4	200	200	0.891	17.8
4	220	200	0.891	17.8
4	240	200	<u>0.891</u>	<u>17.8</u>
			$\bar{L.R.} = 6.33$	$\bar{F.H.} = 126.7 \text{ min}$

Tabla #6.- Datos experimentales para calcular el F_H

Se colocaron geoméricamente 10 termopares en la cámara del horno. Se reporta unicamente el termopar en el punto más frío para fines del cálculo F_H considerando que el valor mínimo que debe reunir un Ciclo de Esterilización es de 30 min.

$$F_H = L.R. \times T \text{ (min.)} \quad \left(\frac{Tr - Tb}{Z} \right)$$

$$L.R. = 10$$

Tr = Temperatura en el punto más frío

Tb = Temperatura base, 200°C.

Z = Constante = 20 (para ciclos de horno)

T = Tiempo en minutos.

Sustituyendo valores:

$$L.R. = 6.33$$

$$F_H = (6.33 \times 20 \text{ min.}) = 126.7 \text{ min.}$$

obtener una concentración de 50,000 U.E./vial.

b).- 0.2 ml. de la Solución "A" en 5 frascos viales para tener una concentración de 100,000 U.E./vial.

4.- Prepare 3 viales Blancos Negativos (Agua Destilada libre de pirógenos) y 3 viales Blanco Positivos, éstos últimos con una concentración de 500,000 U.E./ml.

5.- Deje secar los viales bajo campana de flujo laminar.

6.- Tape con papel aluminio despirogenizado, una vez secos los viales.

7.- Coloque los viales en el horno a 200°C. por 2 Hrs.

8.- Retírelos al termino del tiempo y déjelos enfriar a temperatura ambiente.

9.- Reconstitúyalos con Agua apirogénica a la mitad del volumen original del vial.

10.- Recobre la endotoxina de los viales agitando en vortex o baño de ultrasonido.

11.- Realice la Prueba L.A.L. siguiendo el Método descrito en la Pág. 52

Tabla de Identificación (Fig.#8)

<u>Concentración en viales</u>	<u>Identificación</u>
50,000 U.E./ml.	a, b, c, d, e
100,000 U.E./ml.	1, 2, 3, 4, 5
Blanco Positivo (500,000 U.E./ml.)	I, II, III
Blanco Negativo	x, y, z

Resultados obtenidos:

	a	b	c	d	e
	1	2	3	4	5
Conc. 50,000 U.E./ml.	-	-	-	-	-
Conc.100,000 U.E./ml.	-	-	-	-	-
Blanco Positivo	+	+	+	+	+
Blanco Negativo	-	-	-	-	-

Interpretación

(-) No gel. Ausencia de endotoxina por abajo de 0.12 U.E./ml.

(+) Gel firme. Prueba positiva. Reactivo respondiendo a la concentración conocida del Control Positivo.

La última parte se conformó sometiendo a prueba, a través de su agua de enjuague, 10 muestras de frascos viales y ampollitas apirogénicas momentos antes de entrar a proceso - en su etapa de llenado.

El muestreo se hizo dentro del Area Aséptica bajo condiciones controladas (flujo laminar) y extremando precauciones, se depositaron de 20 a 30 contenedores en un matraz Erlenmeyer despirogenizado, se adicionó Agua Destilada Libre - de Pirógenos para extraer la posible fracción de endotoxina ayudados por un agitador vortex y baño de ultrasonido. En el inter se incubó la muestra a 30°C. para facilitar la dispersión de endotoxinas en el Agua.

De cada uno de los 10 matraces se tomó 0.1 ml. del -- Agua de lavado y se hizo reaccionar frente a 0.1 ml. del -- reactivo L.A.L. evaluando según criterio Gel-No Gel. Ninguna de las 10 muestras propiciaron la formación de un gel firme, como lo mostró un Control Positivo, corrido a la par. Esto -

indica que la concentración de endotoxina era mucho menor a la concentración del reactivo usado.

4.1.14.- DETECCION DE ENDOTOXINA EN AIRE COMPRIMIDO.

La evaluación de la contribución pirogénica del aire comprimido ayuda a que este servicio no disminuya la calidad de un proceso de manufactura. Frecuentemente es utilizado para secar tanques y accesorios menores requeridos por el proceso mismo.

Para lograrlo se probaron 3 formas de muestreo.

Forma A.- Dejar que fluya el aire por 30 min. en un matraz Erlenmeyer apirogénico. Arrastrar con Agua apirogénica y auxiliándose de un baño ultrasonic. Probar la solución resultante con 0.1 ml. de Reactivo L.A.L.

Forma B.- El mismo fundamento que "A" pero ahora usando 200 ml. de Agua Destilada apirogénica en un matraz Erlenmeyer de 500 ml.

Forma C.- Substituir el Agua apirogénica por Solución -- Amortiguadora de Fosfatos pH 7.

Control Negativo.- Se burbujea aire prefiltrado por 30 min. en un matraz Erlenmeyer apirogénico conteniendo 250 ml. de -- Agua libre de pirógenos previamente evaluada.

Control Positivo.- Se muestrea aire del medio ambiente y se hace incidir sobre un medio acuoso como el que se describe para Control Negativo.

Operativamente se seleccionaron 2 puntos de muestreo: Punto R, salida inmediata del Generador de Aire Comprimido, sin -prefiltro-filtro; Punto "S", Toma de Uso en Area Estéril, aire filtrado. Teniéndose las siguientes observaciones:

Las 72 pruebas realizadas incluyendo el Control Positivo y las tomas de aire sin filtrar, más susceptibles al resultado positivo esperado, fueron reproducibles reportando resultados negativos. Algunos tubos de reacción presentaron ligeros grumos - que no llegaron a gelificar pero que desvían la orientación del análisis a parámetros como: estudio cromatográfico de las soluciones donde se burbujeó el aire en busca de interferencia química con L.A.L., sensibilidad del reactivo, partículas contaminantes suspendidas en el aire del medio ambiente que formó el Control Positivo, etc.

Finalmente como información adicional anotaremos que la Prueba de Control en Proceso más común para dar seguimiento a la calidad microbiológica del aire comprimido en esencia consiste en burbujear aire de la toma de uso en Medio Nutritivo líquido (soya y tioglicolato), incubar y observar turbidez. Obviamente el factor tiempo representa una razón de peso para continuar en el desarrollo de un procedimiento práctico que evalúe el aire en menor tiempo.

CAPITULO V

5.1.- RESUMEN.

Independientemente del Método o forma de evaluación que se use, la elaboración de un producto inyectable farmacéutico conlleva la responsabilidad de probar su calidad microbiológica para asegurar que no es virogénico.

Después de más de 40 años, la Industria Farmacéutica cuenta con un Método Alternativo para evaluar la calidad pirogénica en Agua de Uso Farmacéutico (Agua para Inyección, Agua Bacteriostática para Inyección, Agua Estéril para Inhalación, Agua Estéril para Inyección y Agua Estéril para Irrigación). Su uso está ampliamente autorizado previa validación en particular.

La Prueba Oficial de Pirógenos (in-vivo) estimuló el desarrollo de la Prueba de Pirógenos In-Vitro por su alto costo, - difícil ejecución, variabilidad común de todo sistema biológico, tiempo de respuesta, etc.

La Prueba In-Vitro a base de amebocitos de *Limulus*, lisados y liofilizados, se nos ofrece en primera instancia como una Prueba de Pirógenos "presuntiva" para productos inyectables farmacéuticos. Una vez demostrada su equivalencia y paralelismo con la Prueba U.S.P., alcanzará el mismo rango ("confirmativa") que ésta última, tal y como sucedió con la autorización por la Food and Drug Administration para aplicarse en Agua de Uso Farmacéutico.

Prácticamente la utilización del Método In-Vitro representa para el Laboratorio de Control una alternativa en la liberación de Agua para uso en fabricación, como un servicio de Control hacia Producción que debe darse en el menor tiempo posible sin que afecte de paso la programación de las pruebas In-Vivo - para Producto Terminado. Sin embargo es recomendable su aplicación en primera instancia como una Prueba de Control en Proceso para desarrollar habilidad en el manejo e interpretación de la metodología L.A.L.

CAPITULO VI

6.1.- CONCLUSIONES.

De la comparación obtenida entre la Prueba Farmacopeica y la Prueba In-Vitro del lisado de amebocitos de *Limulus* (L.A.L.) se tienen las siguientes conclusiones:

1.- La Metodología experimentada comprueba las bases para aplicarse como una Prueba de Control, en Proceso.

2.- Se probó con buenos resultados que la Prueba In-Vitro es un valuarte para el control del grado pirogénico en los Servicios Auxiliares como aire comprimido, vapor, contenedores primarios, etc.

3.- Se observó que la Prueba es aplicable a nivel de Materia Prima (a base de Clorhidrato de Lincomicina) y Producto Terminado. El trabajo experimental mostró buena compatibilidad con el liofilizado de amebocitos de *Limulus*.

4.- Comprobamos que esta Prueba de Pirógenos, integrada a un Sistema o Red de Agua validado, es un parámetro de alerta ante la presencia inesperada y no deseable de fuentes pirogénicas. El area de Mantenimiento recibe en poco tiempo información de las condiciones microbiológicas del suministra de Agua.

5.- La Prueba es eficiente para ser usada en Procesos Farmacéuticos. En el costo de ambas pruebas, la de conejo es más cara ya que es indispensable un Bacterio instalado (equipo, animales certificados, etc.) y en el caso del reactivo L.A.L. es el costo del mismo y la habilidad de la persona que la desarrolla.

6.- Se propone una secuencia lógica y sencilla para utilizar el reactivo L.A.L. semicuantitativamente por su respuesta -gel-no gel.

CAPITULO VII

7.1.- BIBLIOGRAFIA.

- 1).- Good, C.M., The Biochemistry of Pyrogens.- Bull. Parent. Drug Assoc. Vol. 31 #3 Pág.117 Jun. 1977.
- 2).- Hellon, R.F.- Pharmacol. Rev., 26 289 (1974).
- 3).- Chang, C.M. and Mowotny, A., Immunochemistry, 12, 19 (1975).
- 4).- M. Niwa, K.C. Milner.- Alteration of physical, Chemical - and biological properties of endotoxin by treatment with mild alkali.- J. Bacteriol., 97, 1069 (1969).
- 5).- A. Taub and F. Hart.- Detoxification of pyrogens by -- hydrogen peroxide in some USP injections.- J. Am. Pharmac. Assoc., 37, 246 (1948).
- 6).- K. Tsuji and S.M. Harrison.- Dry-heat destruction of lipo polysaccharide; Dry-heat destruction kinetics.- Appl. -- Environ. Microbiol., 49, 1(1975).
- 7).- Akers, Ketron, Thompson.- F-value requirements for the -- destruction of endotoxin in the validation of dry heat -- sterilization-despyrogenation cycles.- J. Parenter. Sci. Technol., 36, 23(1982).
- 8).- Csako, Klin, Hoschtein and Tsai.- Physical and biological properties of U.S. Standar Endotoxin E.C. after exposure to ionizing radiation.- Infect. Immunol., 41, 190 (1983)
- 9).- L.L. Nelson.- Removal of pyrogens from parenteral solu- tions by ultrafiltration.- Pharm. Technol., 2(5), 46,1978.
- 10).- J.F. Cooper.- Principles and Applications of the Limulus Test For Pyrogen in Parenteral Drugs.- Bull. Parent. Drug Assoc., Vol.29 #3 Jun.1975.
- 11).- E.T. Yin, C. Galanos.- Picogram-sensitive assay for endo- toxin: Gelation of Limulus polyphemus blood cell lysate - induced by purified lypopolysaccharides and lipid A from Gram-negative Bacteria.- Biochim. Biophys. Acta, 261, -- 284(1972).

- 12).- J.F. Cooper, J. Levin, H. Wagner.- Quantitative comparison of in-vitro and in-vivo methods for the detection of endotoxin.- J. Lab. Clin. Med., 78, 138 (1971).
- 13).- Cooper, J.F. and Hochstein.- The limulus test for endotoxin (pyrogen) in radiopharmaceuticals and biologicals, - Bull. Parent. Drug. Assoc. 26, 153-162 (1972).
- 14).- Código de Reglamentos Federales de los Estados Unidos. Alimentos y Medicamentos.- Título 21.- Partes 200 a 299. Parte 211 Buenas Prácticas de Manufactura Vigentes para Productos Farmacéuticos.- Revisión del lo. de Abr./1984. Pág.22; 211:113-B.
- 15).- Brauss, F.W. Kruger, D. Zimmermann, G.- A comparison of an immuno-fluorescence test for excluding salmonellae -- with conventional methods.- Arzneim-Forsch/Drug Res.
- 16).- Insalata, N.F., Dunlap, W.G.- Appl. Microbiol. 25, No.2 - (1973).
- 17).- Thomason, B.M., Herbert, G.A.- Appl. Microbiol. 27, No.5 (1974)
- 18).- Lingnau, J.- Acta Pharm. Techn. Suppl. 2, 145 (1977).
- 19).- Seymour S. Block.- Desinfection, Sterilization, and Preservation.- 3a. Edic. LEA & Febiger 1983, Pág.137.
- 20).- Spooner, D.F.- Microbiological Criteria for non sterile pharmaceuticals.- Mfg. Chem. Vol.56 #5, May.1985, p-71.
- 21).- Farmacopea de los Estados Unidos (U.S.P.) XXII, Pág.1515.
- 22).- The Federal Register, part 141 (41 FR 28404, Jul.9, 1976) Sub-Part L 212.224, 212.225 y 212.226.
- 23).- Falce, Dale.- Sistemas de Clorinación para Control Bactericida.- Water, Eng. and Management, Vol.133, No.10, --- Oct.1986, p.36-37.
- 24).- Gorden, Lourie.- Uso industrial de resinas de intercambio iónico.- The Chem. Eng., Núm.429, Oct.1986.
- 25).- J.D. Sullivan and S.W. Watson.- "Factors Affectin the -- Sensitivity of Limulus Lysate".- Appl. Microbiology 28; (1974).
- 26).- Bernard T. Loftus and Roberto A. Nash.- Pharmaceutical - Process Validation. Vol.23 Pág.77.- Marcel K. Dekker, Inc. New York and Basel. 4a. Edic. One book of Drugs and The Pharmaceutical Sciences, Series.

- 27).- Idem. Pág.70.
- 28).- Salvatore Turco, Roberto King.- Sterile Dosage Forms. 2a. Edic.- Lea & Febiger.- Pág.377.
- 29).- Lachman Leon.- The Theory and Practice of Industrial Pharmacy.- 2a. Edit.- Lea & Febiger. Pág.582-584.
- 30).- Wasynczuk, J.- Validation of aseptic filling processes. Pharmaceutical Technology, May.1986.- Pág.36.
- 31).- J. Levin and F.B. Bang.- Clottable Protein in Limulus: -- Its localization and Kinetics of its Coagulation by Endotoxin.- Thromb. Diath. Haemorrh. 19: 186(1968).
- 32).- Armistead, R.L., et. al.- Diseño y Operación de Instalaciones para Pruebas de Pirógenos.- Bull. Parent. Drug -- Assoc. Vol.31, #1, Pág.14-17, Enero/Febrero.1977.
- 33).- MVZ Raquel González de Guerrero.- Compendio Básico de Cunicultura.- S.A.G. Dirección General de Avicultura y Especies Menores.- Programa Nacional de Cunicultura.
- 34).- Farmacopea de los Estados Unidos (U.S.P.) XXII, pág.1494.
- 35).- 21 CFR Ch. (4-I-90 Edition) 436.32 Pyrogen Test. Pág.274.
- 36).- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.- 5a. Edic. -- 1988, México. Pág.225.