

74
2o.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"FARMACIA HOSPITALARIA Y COMUNITARIA"

"REVISION BIBLIOGRAFICA DE LA PRUEBA DE LISADO DE AMEBOCITO DE LIMULUS (LAL) PARA DETECCION DE ENDOTOXINA BACTERIANA EN PRODUCTOS FARMACEUTICOS INYECTABLES"

TRABAJO DE SEMINARIO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
IRENE SOLANO SOLANO

ASESORES: QFB. MA. EUGENIA R. POSADA GALARZA.
QFB. RICARDO OROPEZA CORNEJO.
QFB. CECILIA HERNANDEZ BARBA.
QFB. BEATRIZ DE J. MAYA MONROY.

258702

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

A 14, DE ENERO, DE 1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

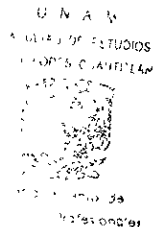
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
PRESENTE.

AT'N: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CEBALLOS
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES-C.

Con base en el art. 51 del Reglamento de Exámenes Profesionales de la FES-Cuautitlán, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Seminario:

"Farmacia Hospitalaria y Comunitaria." °
"Revisión bibliográfica de la prueba de Lisado de Amebocito de
Limulus (LAL) para detección de endotoxina bacteriana en productos
farmacéuticos inyectables.

que presenta la pasante: Irene Solano Solano
con número de cuenta: 8352333-7 para obtener el Título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VISTO BUENO.

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, a 5 de Diciembre de 19 97

MODULO:	PROFESOR:	FIRMA:
1°	QFB Beatriz de J. Maya Monroy	
2°	QFB Ricardo Oropeza Cornejo	
4°	QFB Ma. Eugenia B. Posada Galarza	

DEP/VOBOSEM

CONTENIDO

CAPITULO	pag.
1.- Introducción	7
2.- Objetivo	9
3.- Antecedentes	10
4.- Generalidades	12
4.1 Pirógeno	12
4.2 Endotoxina	13
4.3 Endotoxina referencia estándar (ERS)	17
4.4 Endotoxina control estándar (ECS)	18
4.5 Lisado de Amebocito de Limulus (LAL)	18
5.- Prueba de pirógenos en conejo	26
5.1 Prueba	26
5.2 Material y diluentes	26
5.3 Registro de temperatura	26
5.4 Animales de prueba	27
5.5 Procedimiento	27
5.6 Interpretación y seguimiento	27
5.7 Limitaciones de la prueba	28
5.8 Sensibilidad de los conejos a las pirógenos	29
5.9 Interferencias en la prueba	
6.- Aplicación de la prueba de LAL en productos farmacéuticos inyectables.	33

6.1	Introducción	33
6.2	Condiciones preliminares	34
6.3	Determinación de endotoxina límite (EL)	35
6.4	Determinación de la máxima dilución válida (MDV)	35
6.5	Validación de la prueba de LAL	36
6.6	Requerimientos para validar la prueba de LAL	42
6.7	Diferentes métodos para determinar la prueba de LAL.	43
6.8	Limitaciones	46
6.9	Ventajas	47
7.-	Estudios de la aplicación de la prueba de LAL	48
7.1	Aplicación de la prueba en ciprofloxacina	48
7.2	Corrección de PH con ácidos y bases débiles en el ensayo de pirotógenos por el Limulus Test	49
7.3	Sustitución de la prueba de pirogenos en conejo por la prueba de LAL	51
8.-	Conclusiones	55
9.-	Bibliografía	58

DIAGRAMA DE FLUJO EN LA APLICACION DE LA PRUEBA DE LAL

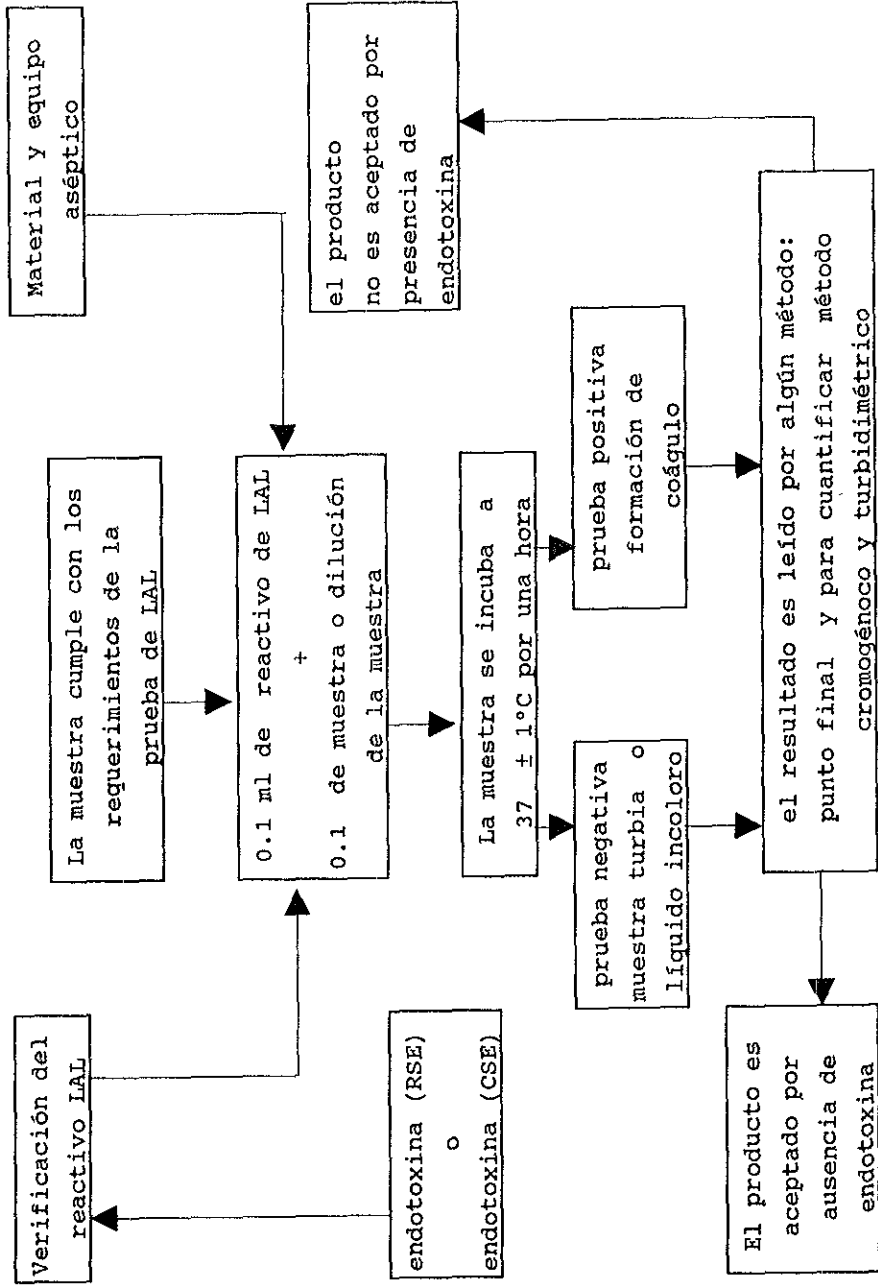
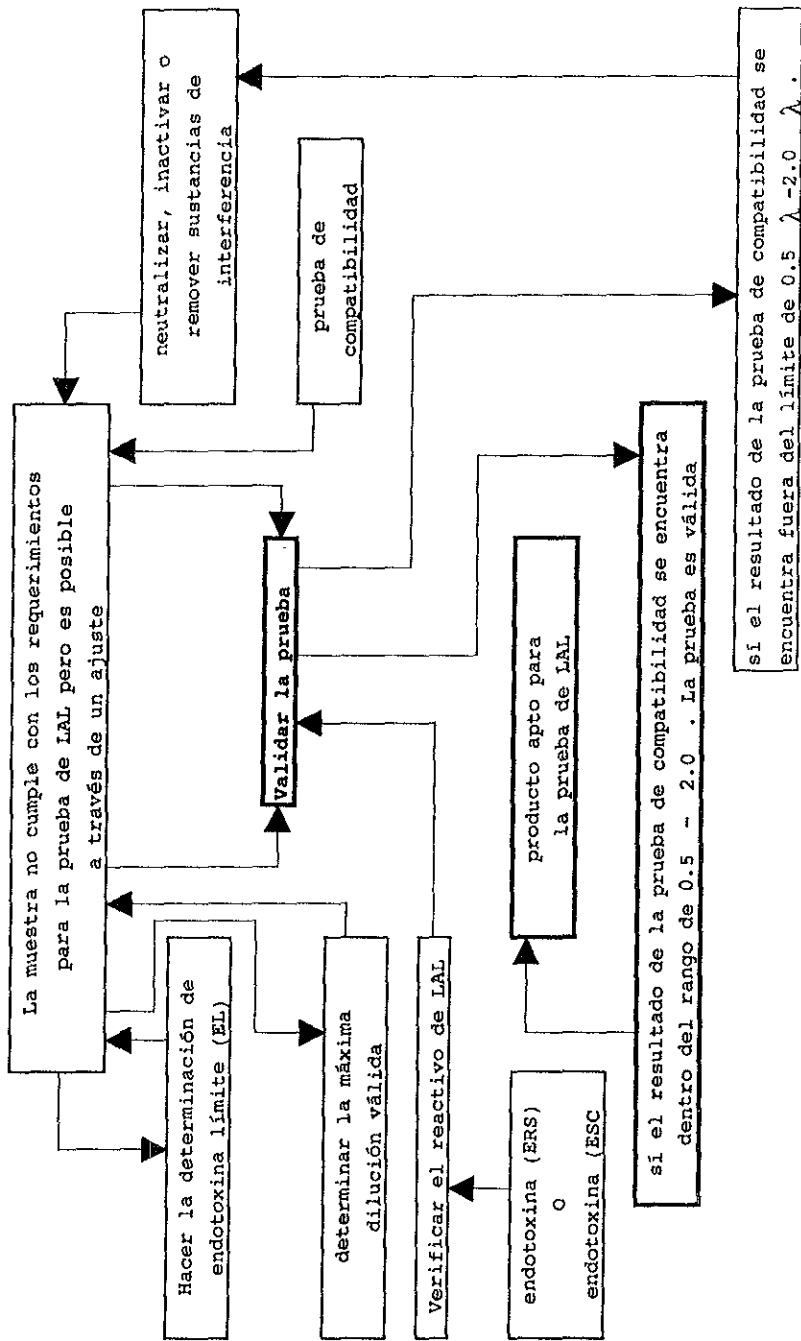


DIAGRAMA DE FLUJO EN LA APLICACION DE LA PRUEBA DE LAL



CAPITULO 1

INTRODUCCION

El proceso de control de calidad implementado a lo largo de toda la secuencia de pasos en la elaboración de un medicamento, permite poner a la disposición del público, productos que cumplan con los requisitos establecidos en la Ley General de salud para que sean: eficaces, seguros, inocuos y libres de contaminación bacteriana. Esto garantiza que al ser administrados en personas enfermas produzcan un cambio favorable en las condiciones de salud del paciente.

Dentro de las pruebas de control de calidad que un laboratorio farmacéutico lleva a cabo en los productos que elabora, tiene gran importancia las pruebas biológicas y las microbiológicas, debido a que algunas características farmacológicas, toxicológicas y farmacotécnicas de los medicamentos no pueden ser evaluadas por procedimientos físicos o químicos. Mediante la realización de estas pruebas se determina el efecto que el medicamento produce sobre un animal, un órgano, un tejido, en cultivos celulares, o en microorganismos, lo cual será indicativo de la respuesta terapéutica que producirá cuando se administre al paciente.

Las pruebas biológicas o microbiológicas son muy diversas, dependiendo de el origen de la materia prima, forma farmacéutica o características que se desean evaluar y exigen cierto grado de especialización y competencia. Se aplican principalmente a materiales de origen animal, vegetal, mineral y microbiológico, así como a formas farmacéuticas parenterales.

Algunos ejemplos de determinaciones en productos farmacéuticos que requieren realizarse mediante pruebas biológicas y microbiológicas en productos farmacéuticos son: la virulencia y toxicidad de una vacuna; la contaminación cualitativa y cuantitativa de microorganismos, la actividad inhibitoria del

desarrollo bacteriano de algunos componentes de la fórmula y la esterilidad de una solución parenteral.

Tanto la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) como la Farmacopea De Los Estados Unidos De Norteamérica (USP) especifican las normas oficiales de calidad para los productos farmacéuticos.

Las farmacopeas y las diversas autoridades no han sustituido el ensayo de pirógenos en conejo para la detección de endotoxina, salvo para agua inyectable (USP). Esta disposición no ha podido ser generalizada a las monografías de la farmacopea a otros productos inyectables.(1)

Ya que es susceptible de que en un producto existan pirógenos bacterianos como endotoxina. La propuesta de diversas guías de aplicación han sido dadas a conocer como la que aparece en la Farmacopea (USP) y otras farmacopeas así como algunas referencias bibliográficas en donde se ha llevado a cabo la sustitución de la prueba de pirógenos en conejo por la prueba de LAL para endotoxina bacteriana en productos inyectables en la industria farmacéutica.(2) Por otro lado las limitaciones de la prueba de pirógenos en conejo facilita el uso de la prueba de LAL en productos farmacéuticos como radio fármacos, anestésicos y hormonas.

En esta revisión bibliográfica solo se describe la aplicación de la prueba de LAL para productos farmacéuticos inyectables que al parecer tiene un potencial de aplicación en productos parenterales sobre todo en aquellos que está limitada la prueba de pirógenos en conejo.

CAPITULO 3

ANTECEDENTES

Desde 1940, la prueba de pirógenos en conejo ha sido reconocida por la mayoría de las farmacopeas. Con la introducción de la prueba LAL, numerosos estudios fueron iniciados en los años de 1970 y 1980 por la industria farmacéutica y las autoridades regulatorias para comparar la prueba de LAL y la prueba de pirógenos en conejo.

Mediante los estudios realizados para determinar la dosis umbral pirogénica (TPD) en conejo. Ha sido posible fijar un límite de endotoxina en fármacos inyectables para humano. De esta manera es decidida la dosis máxima de endotoxina que puede ser administrada parenteralmente en humano promedio sin causar reacción pirógenica. Esta es la base para los límites de endotóxina dados en Farmacopea, tales como la U.S.P.

En 1987 en los Estados Unidos la FDA reglamento la validación de la prueba de LAL para fármacos inyectables y utensilios médicos. Este documento representa la experiencia acumulada de las autoridades regulatorias y llegar a usarla como prueba de rutina confiable en la industria farmacéutica. La prueba de LAL puede ser aplicada en tres formas:

- 1.- Una Reacción enzimática la cual hace uso de la formación de un coágulo en la presencia de endotoxina ensayo cualitativo.
- 2.- Una reacción enzimática en la cual el sustrato incoloro cambia a un producto de color en presencia de endotoxina. Ensayo cromogénico cuantitativo.
- 3.- Una Reacción enzimática en la cual hace uso de la formación de un coágulo en presencia de edotoxina más una dilución en la cual la densidad óptica del precipitado de proteína caagulada será leída contra una curva estándar.

El procedimiento de prueba para los tres ensayos requiere un lisado de amebocito de *Limulus* estándar y una endotoxina control estándar (CSE) para confiabilidad de la prueba. En función de

estandarizar todas las prueba de endotoxina en la industria farmacéutica, la U.S.P. Y La Food and Drug Administration (FDA) de Los Estados Unidos de América desarrollo una Endotoxina Referencia Estándar (RSE) conocida como EC-5. La potencia de este estancar fue establecido por la recopilación de resultados de un estudio de colaboración entre catorce laboratorios y es expresado en Unidades de Endotoxina por mililitro (EU/ml.).

La prueba de rutina y la validación precisan de ciertos requerimientos: usar equipo común en un laboratorio.

Los reactivos deberán ser los autorizados por la FDA y seleccionar el ensayo (coagulación turbidimétrico y cromogénico) el cual tendrá que ser validado.

El procedimiento de coagulación y el cromogénico son sencillos, adicionar la muestra y el control positivo al reactivo LAL y en seguida incubar a 37°C por una hora para la prueba de coagulación y de diez minutos para la cromogénica.

La prueba de coagulación es leída visualmente inmediatamente después de la incubación. Para la prueba cromogénica después de los diez minutos de incubación se adiciona el sustrato cromogénico y se incuba por seis minutos más y enseguida es leído en el espectrofotómetro.(3)

CAPITULO 4

GENERALIDADES

4.1 Pirógeno:

La palabra Pirógeno proviene de las palabras griegas Pyros, que significa fuego y Gene que significa producir, engendrar; por lo que el sentido literal es "Productor de fuego".(4) Estas son sustancias que producen elevada temperatura en el cuerpo. Whittlet demandó que la palabra griega pyreto fue usada para describir la fiebre. De esta manera las sustancias que producen fiebre deberían ser llamadas apropiadamente como pyretogenos, un termino que es sustituido frecuentemente por la palabra Pirógeno. Los pirógenos han sido divididos en dos clases.

4.1.2 Pirógenos exógenos

Estos se encuentran en el exterior del cuerpo que inducen elevada temperatura cuando son inyectados en el ser humano y en los animales. Aunque el Lipopolisácarido (endotoxina) es el más conocido e importante pirógeno exógeno, hay otros de una amplia variedad química que causan elevada temperatura cuando son inyectados bajo circunstancias apropiadas. En forma general los pirógenos exógenos incluyen los microbios, componentes microbianos de bacterias gram negativo, bacterias gram positivo, hongos, virus, así también como pirógenos no microbianos tales como algunos fármacos, esteroides, fracción de plasma y el adyuvante sintético dipeptido muramil.

4.1.2 pirógenos endógenos (EP)

Los pirógenos endógenos son producidos internamente por el hospedador en respuesta a el estímulo de varios pirógenos exógenos. Se cree que son el primer mediador de la fiebre.(5) (6)

4.2 Endotoxina

El nombre de Pirógeno se ha otorgado principalmente a un grupo de sustancias que son producidas por microorganismos. Todas las formas microbianas producen pirógenos, la principal fuente de éstos son las bacterias gram negativo. Sin embargo la principal reacción pirógenica en los mamíferos se debe al Lipopolisácarido (LPS), este también conocido como "Endotoxina".(7) (4)

El lipopolisácarido es una molécula compleja única que no se encuentra en otra parte de la naturaleza. El peso molecular del LPS es de 400,000 a 4,000,000 Daltons. Este se encuentra en la capa externa de la membrana de bacterias gram negativo. Las endotoxinas son compuestos de alto peso molecular que sobreviven normalmente a ciclos de esterilización por calor, por lo tanto, son inactivados por ciclos prolongados de calor seco, condiciones alcalinas y condiciones ácidas.(8) (5)

La asimetría de la membrana de las bacterias debido al lipolisácarido hace que el sistema inmune lo reconozca, así mismo la interacción con los antibióticos y las bactericinas. Aunque inicialmente se pensaba que la endotoxina se producía cuando se lisaban la bacterias, ahora sabemos que muchas bacterias gram negativo se despojan del LPS durante el ciclo de su vida, perdiendo cantidades aproximadamente del 5% del total de endotoxina celular por cada generación. Tesh y Morrison han reportado cantidades tan altas como el 30 % semejante a lo que refleja una situación in vivo.

El LPS consiste de tres regiones químicas diferentes unidas covalentemente. Estas tres regiones se encuentran en la figura(1) empezando con la más externa son: (1) cadena específica "O" (Antígeno "O"), (2) polisácarido central, y (3) lípido A.

4.21 ANTIGENO "O"

Esta región es probablemente la parte más conocida de la molécula de LPS.

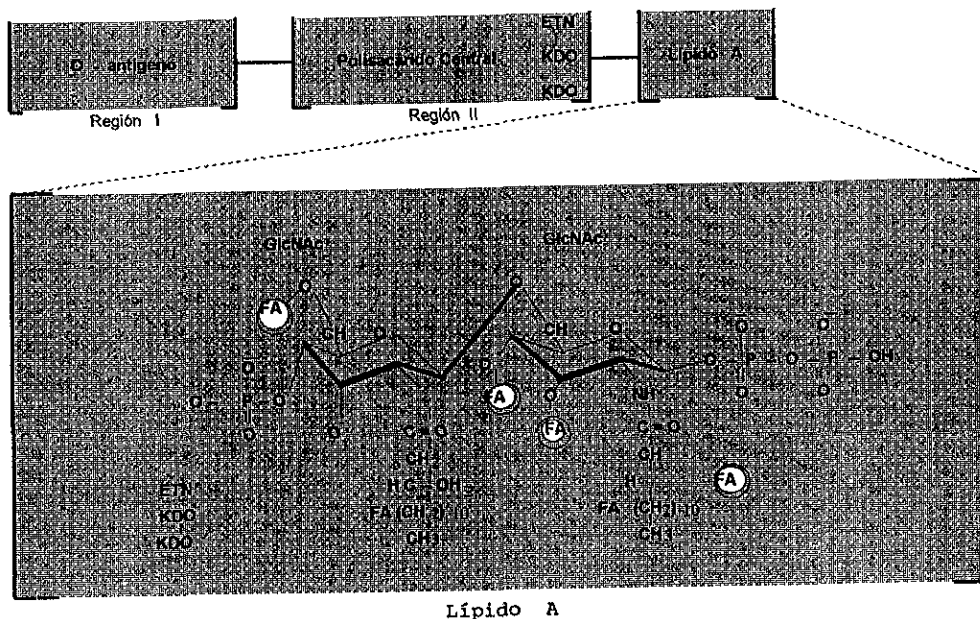


FIG. (1) estructura del lipopolisacárido. KDO = Cetodesoxioctonato; FA = ácido graso, ETN = Etanolamina, GlcN = N-acétil glucosamina

La cadena específica "O" es una serie terminal de combinaciones repetidas de oligosacáridos que se encuentran en la parte más externa de la pared celular de las bacterias gram negativo; son los que producen las determinantes moleculares del tipo específico. Esas determinantes dan una mayor especificidad a los anticuerpos "O" y han sido empleados por décadas en la clasificación y taxonomía de serotipos de la *enterobacteriaceae*. Como es ejemplificado por la clasificación de Kauffmann White para *Salmonella*. El antígeno "O" es comúnmente conocido como antígeno Somático; también conocido como antígeno liso debido a que la cadena específica "O" le confiere a la colonia una superficie lisa. La estructura y composición de esta región a mostrado gran actividad biológica, como lo muestran algunos 1500 serotipos de *Salmonella* que carecen de cadena específica "O" por la defectuosa biosíntesis del LPS, el resultado es un mutante

rugoso específico (R), conocido como **Ra** mutante. Con lo que se refiere al polisacárido central si el LPS carece de este los mutantes también serán sensibles a los antibióticos.

4.2.2 POLISACARIDO CENTRAL

La región central presenta poca heterogenicidad y es similar a un género dado. El polisacárido central es también conocido como el antígeno de colonia rugosa. La principal función fisiológica del polisacárido central es la traslocación e integración del LPS dentro de la membrana externa y le confiere estabilidad a la membrana vía unión entre catión proteína y lipopolisacárido. Esta región puede ser subdividida en: 1) polisacárido central interno próximo al lípido A, 2) polisacárido central externo distal al lípido A.

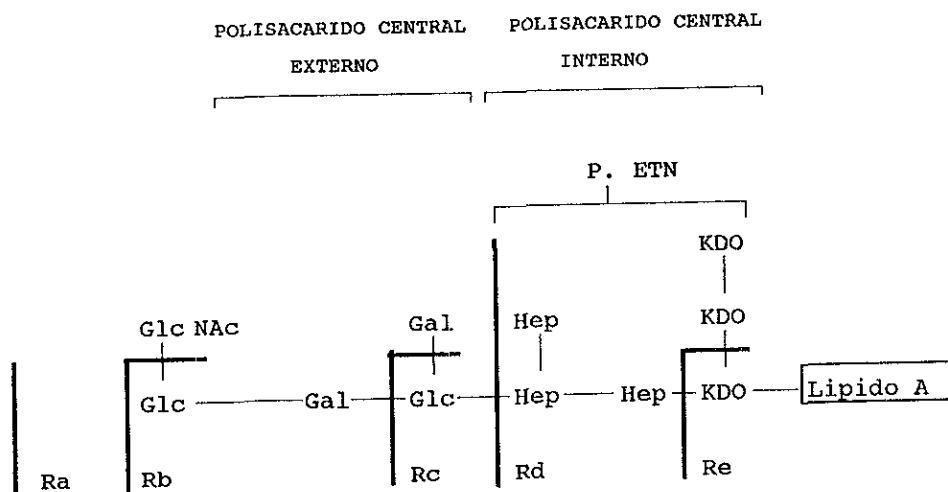


FIGURA (2) Diagrama representativo de oligosacárido central y varios mutantes (Ra-Re) de *Salmonella minnesota*, indicado por ETN=Etanolamina; P=fosfato; Glc=D-glucosa; Gal=D-galactosa; GLcNac=N-acetil-D-glucosamina.

La región central interna próxima al lípido A del polisacárido tiene dos constituyentes y son: un azúcar no común único de las bacterias el cual está constituido de ocho carbonos 2-ceto-3-ácido desoxioctónico (KDO) y heptosa. El grupo KDO comprende el enlace a el lípido A.

En los últimos años a través de la producción sintética del lípido A se ha dado a conocer la importancia de este enlace y la influencia que ejerce en la potencia de la actividad biológica de la endotoxina. (8)(9) Es también importante conocer que ambos, el KDO y la heptosa en algunas moléculas de LPS de ciertas bacterias no las contienen. Tal es el caso de *Bacteroides fragilis*. El efecto principal es la pérdida de la actividad biológica de la endotoxina de *B. fragilis*. Otros mutantes han sido también identificados como se describe en la figura (2).

4.2.3 LÍPIDO A

Comparado con la cadena "O" y el polisacárido central, el lípido A es la parte más interesante de la molécula del LPS. El lípido A es similar a los fosfolípidos derivados del glicerol con una molécula de ácido graso unido a el azúcar fig. (1); un ácido graso y ácido 3-hidroximirístico. Es extraño pero único que una molécula de LPS contenga un ácido graso de catorce carbonos. Una parte del ácido graso imparte hidrofobicidad a la molécula y también le sirve de ancla a el LPS con la membrana externa. El lípido A está unido vía enlace glicosido peptidoglicán, aunque el lípido A de diferentes géneros de bacterias pueden mostrar variabilidad o microheterogenicidad, el elemento común es la estructura del lípido A, y el disacárido β 1,6-D-glucosamina difosforilado. En *Pseudomona diminuta* y *Pseudomona vesicularis* no se encuentra la estructura del lípido A, por tal razón ninguna de las dos muestran actividad endotóxica como medida para la prueba del lisado de amebocito de *limulus*. Esas diferencias en la estructura de la endotoxina y la presencia o ausencia de la actividad biológica son importantes conceptos en la prueba para

detectar la endotoxina. Por último, cualquier prueba para endotoxina deberá ser más sensible a los niveles de detección humana.

Aunque hay evidencias que indican que la toxicidad primaria de la endotoxina bacteriana reside en los componentes del lípido A, recientes estudios han indicado múltiples actividades para el lípido A asociado a la proteína y el polisacárido KDO componentes de la endotoxina. Ambos han mostrado inducir una sensibilidad mitogénica.

El procedimiento clásico de Westphal tal vez sea el más aplicable para la extracción del LPS. Método en el cual se usa una mezcla caliente de fenol-agua para separar al LPS. Otros procedimientos son la extracción por solución acuosa de butanol descrito por Morrison y Leive. En el primer procedimiento el lípido A unido a proteína se encuentra disociado, mientras que en el segundo se encuentra unido. Esos métodos sirven como ejemplo de como difieren los procedimientos de extracción que puede resultar en diferentes productos finales.

Así la extracción con butanol acuoso es una extracción mitogénica, mientras que el producto de la extracción con fenol agua no lo es. La forma de extracción es importante ya que diversos productos son aislados por diferentes métodos y el resultado es un producto con diferente actividad biológica.(8)(9)

4.3 Endotoxina referencia estándar (RSE)

De acuerdo a la farmacopea (USP XXIII) es la endotoxina la cual tiene una potencia definida de 10,000 unidades de endotoxina (EU) por vial y debe ser reconstituido con 5 mililitros de agua grado reactivo LAL y mezclado por 30 minutos, usando un mezclador Vortex.

4.4 Endotoxina control estándar(CSE)

De acuerdo a la farmacopea (USP XXIII) Es cualquier preparado de endotoxina semejante a la RSE que ha sido estandarizada respecto a endotoxina referencia estándar (RSE).

Cada lote nuevo debe ser estandarizado antes de usarlo en una prueba.(10)

4.5 Lisado de amebocito de limulus (LAL)

Limulus polyphemus es un cangrejo que ha sido encontrado en lugares específicos a lo largo de la costa oeste de Norte América y a lo largo de la costa sureste de Asia. El corazón de un cangrejo adulto es puncionado y la sangre se colecta con el amebocito circulante (célula sanguínea). El procedimiento no es fatal, y como la sangre sera restituida puede ser utilizado nuevamente. Como los amebocitos actúan como activadores del mecanismo de coagulación en el cangrejo, un inhibidor de la coagulación debe ser adicionado para evitar la agregación. La N-etilmaleidamida es la más comúnmente usada como antiagregante. Las células amebocito son colectadas y lavadas por centrifugación, y lisadas usando agua destilada. El lisado puede también ser producido por ultrasonido, congelación y descongelación y por molienda en un homogenizador de vidrio para tejido. Después del lisado, la suspensión es separada de restos por centrifugación y el sobrenadante es liofilizado. EL liofilizado es necesario para propósitos de estabilidad. El reactivo de LAL es extremadamente sensible a el calor aun así el liofilizado debe permanecer guardado en congelación. La vida media de un lisado reconstituido es de un mes en condiciones de congelación.(4)

En cuanto a su bioquímica: Después que Levin y Bang demostraron que la actividad coagulante de la hemolinfa de limulus reside en el amebocito, Young y sus colaboradores establecieron la naturaleza enzimática de la reacción inducida por la endotoxina.

Mediante una cromatografía en columna con sephadex G-50 y G-75, los colaboradores aislaron 3 picos. Una fracción que contiene la proteína coagulante, con un peso molecular de 27,000 D y fue estable a el calor. La segunda fracción es una sustancia de alto peso molecular, lábil al calor, activada por la endotoxina y formo un gel con la proteína coagulante. La unión de ambos la fracción lábil al calor y la endotoxina indican que la velocidad de reacción es dependiente de la endotoxina.

La fracción lábil al calor fue afectada por un número de enzimas inhibitoras, esta actividad sugiere que estuvo en función de los grupos hidroxilo y sulfidriilo de la serina. Los autores concluyeron que la reacción del lisado de amebocito de limulus con la endotoxina es dependiente de la activación de la enzima de alto peso molecular por la endotoxina, en la cual la proteína coagulante de bajo peso molecular se transforma en gel. Esta reacción es crítica ya que provee el punto final en la convencional prueba de coagulación de LAL.

Sullivan y Watson posteriormente caracterizaron la enzima coagulante de alto peso molecular. La enzima purificada fue aislada de lisado activado con endotoxina por filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y electroforesis con un disco de gel. La enzima activada y purificada en LAL fresco, induce la formación de coagulación, como si se adicionara la endotoxina a el reactivo de LAL. La enzima coagulante tuvo un peso molecular de 84,000 D y contenía dos subunidades, cada una con un peso molecular de 43,000 D. La enzima fue lábil a el calor, sensible al PH y un punto isoeléctrico de 5.5.

Posteriores estudios por Tai y Liu demostraron que la activación de la enzima coagulante, zimogeno (enzima precoagulante) no depende únicamente de la endotoxina sino también de Ca^{+2} . En contraste a Sullivan y Watson, Tai y Liu encontraron que la enzima precoagulante tiene un peso molecular de hasta 150,000 D, fue determinado mediante electroforesis usando dodecil sulfato de sodio (SDS), Y que al parecer consistía de una cadena peptídica sencilla. La exposición de la enzima

reducida y carboximetilada a clorhidrato de guanidina 6 M. fracaso en disociar las subunidades. Porque la enzima fue afectada por los inhibidores de soya y tripsina, este estudio también sugiere que la enzima precoagulante es una proteasa de serina, y lo confirma el estudio de Young y sus colaboradores al inducir la gelación de LAL por tripsina una proteasa de serina.

La proteína coagulante de bajo peso molecular ha sido estudiada por Solum, quien llamo a esta coagulogéno. Usando un procedimiento de acidificación para inactivar a la enzima precoagulante, él pudo purificar coagulogéno por cromatografía usando sephadex G-75 y ácido acético 1.7 M. como eluente. En seguida adiciono un activador (endotoxina) para gelificar al coagulogéno. purifico el coágulo de proteína coagulante de bajo peso molecular por el mismo método que para sustancias no coagulantes. El peso molecular aproximado para coagulogéno fue de 23,000 D y para material coagulante de 17,000 D. El autor concluyo que la perdida de 6,000 Daltons en el peso molecular del coagulogéno fue debido a que la enzima coagulante separo una porción del polipéptido de coagulogéno. Esta conclusión fue consistente con la observación que la tripsina promueve la formación del coágulo en preparaciones tratadas con ácido y las no tratadas.

Nakamura y sus colaboradores demostraron que al adicionar la enzima precoagulante activa obtenida de la sangre de *Tachypleus tridentatus*, cangrejo herradura japonés al coagulogéno, produce una proteína coagulante que consiste de dos cadenas peptidicas y promueve la liberación del péptido C de bajo peso molecular. La secuencia de aminoácidos fue determinado para el péptido C así también para la cadena A de la proteína coagulante; la secuencia parcial fue reportada como cadena B tabla (1). La secuencia octapeptídica terminal C fue significativamente homologa con el fibrinopéptido primo B, sugiere que el coagulogéno y el fibrinopéptido son derivados de un común ascendiente o que el coagulogéno es un prototipo de fibrinogéno primo.

El coagulogéno de *Tachypleus* consiste de una cadena polipeptida base con un peso molecular de 16,000 daltons. Esta contiene 148 aminoácidos residuales y una alanina con un grupo amino ($-NH_2$) y una fenilalanina con un grupo carboxilo ($-COOH$). Cuando la enzima precoagulante activa ejerce su actividad en el coagulogéno el péptido C se separa de la parte central de la molécula madre, con la formación de proteína coagulada. El coágulo consiste de dos cadenas (la A y la B), las cuales están unidas por un puente disulfuro. La secuencia de aminoácidos del coagulogéno de *Tachypleus* puede ser visto en la tabla (1).

La proteólisis específica lleva a la liberación del péptido C en las uniones localizadas en la Arg-Thr y Arg-Gl.

TABLA (1) Secuencia de aminoácidos de α péptido C Y las cadenas A del coagulogéno de *Tachypleus*.

Fragmentos	
Cadena A	H-Ala-Asp-Thr-Asn-Ala-Pro-Ile-Cys-Leu-Cys-Asp-Glu-Pro-Gly- <div style="margin-left: 100px;">Th-4</div> <div style="margin-left: 200px;">Th-2</div> <div style="margin-left: 300px;">Th-1</div> Val-Leu-Gly-Arg-OH <div style="margin-left: 100px;">Th-6</div>
Péptido C	H-Thr-Gln-Ile-Val-Thr-Thr-Glu-Ile-Lys-Asp-Lys-Ile-Glu-Lys- <div style="margin-left: 200px;">T-I</div> <div style="margin-left: 400px;">T-III</div> <div style="margin-left: 300px;">Th-6</div> Ala-Val-Glu-Ala-Val-Ala-Gln-Glu-Ser-Gly-Val-Ser-Gly-Arg-OH <div style="margin-left: 200px;">T-II</div>
Cadena B	H-Gly-Phe-Ser-Ile-Phe-----Phe-OH

α El péptido obtenido de la digestión con tripsina (T) y termolisina (Th) se muestran como líneas solidas.

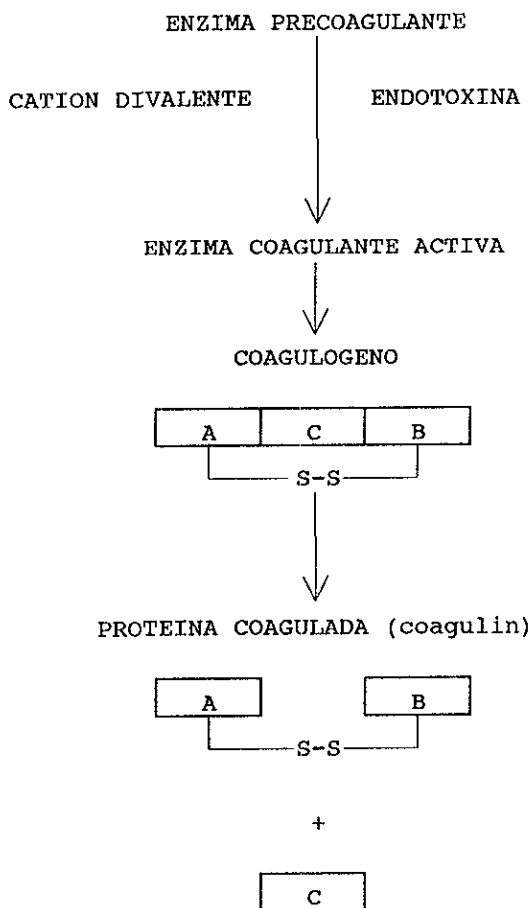


FIGURA (3) mecanismo de coagulación. Una enzima precoagulante contenida en el lisado es activada en presencia de endotoxina y cationes divalentes, tales como Mg^{+2} y Ca^{+2} . La enzima actúa en el coagulogéno (proteína coagulable de bajo peso molecular) y separa al péptido (C) con la formación de proteína coagulada (coagulin). El coagulogéno y la proteína coagulada presentan

un esquema general de la gelificación de coagulogéno inducida por endotoxina se describe en la figura (3).

El grupo Mosesson también como Tai aislaron al coagulogéno. El anterior obtenido por Solum tiene un peso promedio molecular de 23,000 D a partir de una muestra sin reducir y de 12,400 con muestra reducida. Para este caso a pesar de que el gel obtenido por cromatografía a partir de coagulogéno presenta un peso molecular de 19,000 D, al practicarle el mismo tipo de análisis en presencia de urea 8 M indica un peso molecular de 11,500 D. Esto sugiere que el coagulogéno esta constituido de dos cadenas idénticas unidas por un enlace no covalente. La conversión proteolítica del coagulogéno a proteína coagulante (coagulin) mediante endotoxina fue característico de la separación de un mínimo en dos sitios de la cadena. Ese dato refuerza y amplia la observación de Nakamura y sus colaboradores.

Después Tai y sus colaboradores confirmaron que el peso molecular de coagulogéno es 24,500. La substancia consiste de una cadena de polipéptido sencillo de cerca de 220 aminoácidos; cuando el coagulogéno está activado por la enzima coagulante este libera un polipéptido soluble C de aproximadamente 45 aminoácidos y una proteína coagulada insoluble (coagulin) de cerca de 170 aminoácidos. Aunque esto es consistente con lo investigado por Nakamura y sus colaboradores, quienes demostraron 28 aminoácidos en el péptido C, uno debe tener en mente la diferencia potencial bioquímica entre *Limulus* y *Tachypleus*, además es difícil reconciliar la disparidad del número total de aminoácidos en el coagulogéno de *limulus* investigado por el grupo de Tai que es de 220 y el sugerido por el grupo de Nakamura que es de 148. Ambos la enzima precoagulante de *limulus* y la tripsina bovina inducirán la gelación de coagulogéno por efecto de la separación del enlace Arg-Gly y formar coagulin, el cual reacciona en una forma no covalente para formar el coágulo. Recientemente, Ohki y sus colaboradores aislaron un factor de coagulación adicional. Este factor es activado por endotoxina y se convierte en zimógeno o enzima precoagulante, ésta actúa en coagulogéno fig (4).

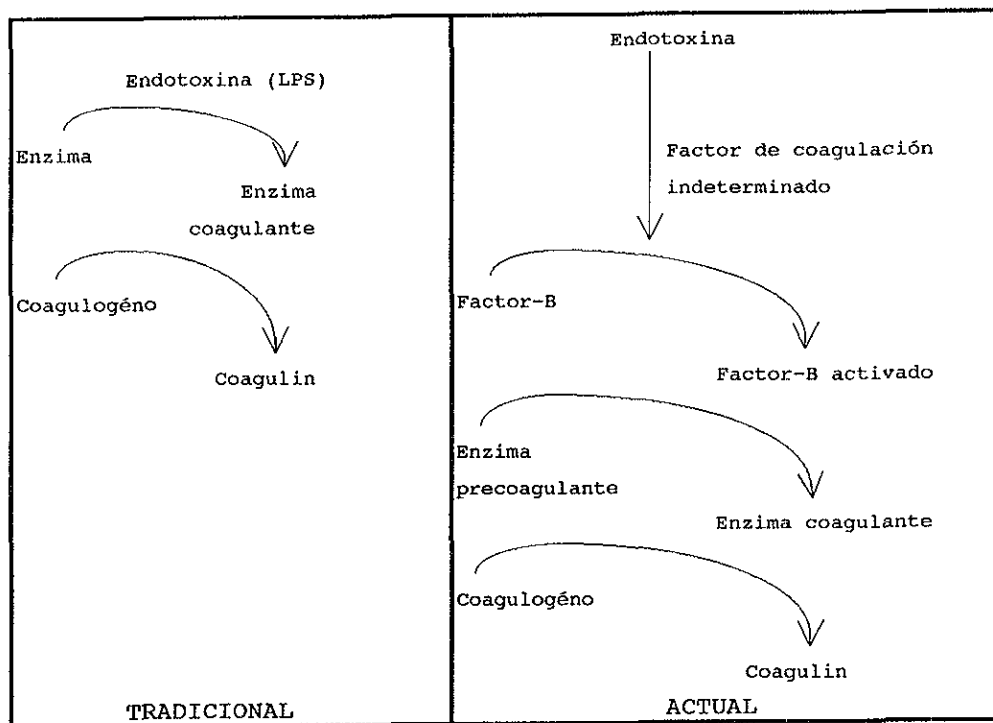


Figura (4) Representación esquemática (tradicional, Actual) de Lisado de amebocito de Limulus.

Aunque ha sido publicada literatura acerca de la cascada de coagulación de LAL inducida por endotoxina, se da a conocer esta como evidencia de una serie de artículos por Nakamura y sus colaboradores. Ellos han identificado un activador de enzima coagulante semejante a la tripsina. La molécula activador se tiene idea que contiene dos subunidades idénticas unidas por enlaces no cobalentes, ellos también encontraron que el peso molecular de la muestra desnaturalizada y la no desnaturalizada son de 22,000 y 50,000, respectivamente. probablemente la subunidad de 22,000 tiene dos cadenas una de las cuales consiste de una cadena polipeptídica múltiple y la otra con un peso

molecular 17,000 D y quizá unida por enlaces disulfuro, los autores concluyeron que una proteasa de serina (proteasa N) probablemente induce la activación proteolítica del proactivador.(5)

CAPITULO 5

PRUEBA DE PIROGENOS EN CONEJO

5.1 Prueba

La prueba de pirógenos viene a ser una prueba oficial de control de calidad para productos parenterales, esta prueba se encuentra escrita por primera vez en la doceava edición de la USP en el año de 1942. Más tarde en 1945 la Regulación Federal de Códigos (CFR) hizo el requerimiento de la prueba de pirógenos para antibióticos.

En base a la USP XXIII. La prueba de pirógenos esta diseñada para mantener un nivel aceptable de riesgo de reacción febril en un paciente él cual ha sido administrado por inyección un producto parenteral. La prueba consiste en medir el incremento en la temperatura del conejo seguida de la inyección intravenosa de la solución de prueba y se aplica a productos que pueden ser tolerados por la prueba en conejos en dosis que no exceda a los 10 mililitros por kilogramo vía intravenosa y dentro de un período de 10 minutos. Para los productos que requieren una preparación preliminar o están sujetos a condiciones especiales de administración, seguir la referencia adicional dado en la monografía o en el caso de antibióticos y biológicos consultar el CFR.

5.2 Materiales y diluentes

Contar con jeringas, agujas y material de vidrio libre de pirógenos por calor seco a 250°C por un mínimo de 30 minutos o por cualquier otro método adecuado. Los diluentes y soluciones para lavado de instrumentos o montajes para inyección parenteral deberán ser tratados de tal forma que asegure su esterilidad y libre de pirógenos en porciones representativas del diluyente y solución de lavado o agua del lavado de los instrumentos. El

cloruro de sodio al 0.9 % es el diluyente específico para inyección.

5.3 Registro de temperaturas

Usar un sensor de temperatura adecuado como un termómetro clínico o termopar que ha sido calibrado para asegurar su exactitud de $+0.1$ °C . Insertar el sensor de temperatura dentro del recto del conejo de prueba a una profundidad máxima de 7.5 cm. y después de un período de tiempo de no menos al que ha sido determinado previamente como suficiente, registrar las temperaturas.

5.4 Animales de prueba

Usar conejos adultos y saludables en jaulas individuales en una área con temperatura uniforme entre 20 y 23°C y libre de ruidos que le provoque excitación. La variación de temperatura no será más de ± 3 °C a la temperatura registrada. Antes de usar un conejo por primera vez en la prueba de pirógenos, condicionarlo en no más de siete días simulando todos los pasos incluidos en la prueba excepto la de inyección. Utilizar un conejo cada 48 horas. No antes de 2 semanas si el incremento de temperatura es de 0.6 °C o más o seguida de una prueba donde la muestra de prueba presente pirógenos.

5.5 Procedimiento

Realizar la prueba en una área separada y diseñada solamente para la prueba de pirógenos bajo condiciones ambientales similares a las mostradas por el hábitat de los conejos y libre de ruidos que le provoquen excitación. Retirar toda clase de alimento durante el periodo de prueba. Si el termopar de prueba permanece insertado durante el periodo de prueba. El conejo permanecerá sujeto del cuello y asegurando que se encuentre en

una postura de descanso natural durante la prueba. 30 min. antes de la inyección, tomar la temperatura control de cada conejo, esta sirve de base para determinar cualquier incremento en la temperatura que resulte de la inyección de la solución de prueba. En cualquier grupo de conejos de prueba, usar únicamente aquellos en los cuales la temperatura control no difiere por más de 1°C entre ellos. No usar los conejos que presenten una temperatura que exceda a 39.8 °C. A menos que difiera la especificación en la monografía individual, inyectar en un periodo de 10 minutos y dentro de la vena de la oreja de cada uno de 3 conejos 10 ml. de solución de prueba por Kg. de peso. La solución de prueba es cualquier producto reconstituido como lo indica la etiqueta o de acuerdo a la monografía individual. Inyectar en la dosis específica.

5.6 Interpretación y seguimiento

Considerar cualquier decremento de la temperatura como cero. Si el conejo no muestra un incremento de 0.5°C o más con respecto a su temperatura control, el producto esta dentro de los requerimientos por la ausencia de pirógenos . Si cualquier conejo muestra un incremento individual de 0.5 o más, realizar una prueba adicional utilizando 5 conejos más. Si tres de los ocho conejos muestran un incremento individual de 0.5°C o más y si la suma de los ocho no excede de 3.3, el material probado esta dentro de los requerimientos por la ausencia de pirógenos.(10)

5.7 Limitaciones de la prueba

La prueba de pirógenos en conejo de la USP sufre varias limitaciones las cuales facilita el uso de la prueba de Lisado de Amebocito de Limulus como una posible alternativa de la prueba en conejos.

Las limitaciones son: se utiliza un animal vivo como modelo por lo que ofrece varios problemas debido a que es un sistema

biológico. También se conoce que dos conejos no poseen exactamente la misma temperatura en el cuerpo o responden idénticamente a la misma muestra pirógena. Los conejos son extremadamente sensibles y vulnerables a su medio ambiente. Esto llevándose a propósitos económicos en función de las instalaciones, control ambiental y entrenamiento de el animal, es costoso.

La prueba de pirógenos en conejo además de costoso también es laborioso. Ya que :

1. se gasta tiempo en entrenar , adaptar y condicionar a los conejos para facilitar la prueba de pirógenos.
2. los conejos deben permanecer en jaulas limpias para prevenir enfermedades.
3. los conejos deben estar bebidos y comidos apropiadamente.
4. por último se gastan varias horas en realizar la prueba.

5.8 Sensibilidad de los conejos a los pirógenos

En cuanto a la sensibilidad a los pirógenos. La respuesta pirógena en los conejos es dependiente de la dosis. Esto es demostrable en la tabla (2). Tomada de un reporte por Mascoli y Weary.

En el reporte de los primeros estudio de colaboración bajo los auspicios de Health Industry Manufactures Association (HIMA) da a conocer que los conejos de doce laboratorios presentaron una respuesta pirógena en dosis ≥ 1.0 ng por ml. (10 ml./Kg. de 10 ng./Kg. de endotoxina) de *E.coli* 055:B5, y de las colonias que pasaron la prueba (no pirogenicos) en la dosis de 0.156 ng./Kg. (o 0.0156 ng./ml. usando una dosis de 10 ml./Kg.).

El mismo estudio reporto que el promedio de la colonia de conejos alcanzo el 50 % de los que pasan y un 50% de los que no pasan con un intervalo de confianza del 95% a un nivel de endotoxina cercano a 0.098 ng./ml. (dosis de 10 ml./Kg.). La prueba de AL generalmente detecta niveles de endotoxina de 0.025

TABLA (2) Resultado de la prueba de pirógenos en ocho conejos de 3-5 Kg de peso, utilizando endotoxina de E. coli 055:BS en solución. salina

Concentración de endotoxina (ng/ml.)	Volumen de la solución inyectada (ml./Kg)	Incremento total de la temperatura (USP) (°C)	Incremento promedio de temperatura (°C)	Desviación estándar (°C)	Coefficiente de variación (%)
3.125	1.0	7.80 c)	0.975	0.246	25.2
1.56	1.0	4.75 c)	0.594	0.218	36.7
1.00	1.0	3.70 c)	0.462	0.158	34.2
0.78	1.0	1.40	0.144	0.208	144.4
0.39	1.0	1.00	0.088	0.187	212.5
0.195	1.0	1.20	0.150	0.065	43.3

- a) Los conejos que no presentaron incremento en la temperatura fueron excluidos para determinar el incremento total de temperatura de acuerdo a la USP.
- b) Los conejos que no presentaron incremento de temperatura fueron incluidos en la determinación de la media y la desviación estándar. Esto es apropiado porque reflej la variación total.
- c) El criterio para ausencia de pirógenos en la prueba para ocho conejos no excedera a 3.7°C según USP . El estudio se realizó en 1979.

ng./ml. o menos. Así la prueba de conejos es menos sensible a endotoxina que la prueba de AL. También se puede observar la variación que existe entre un conejo a otro en respuesta al mismo lote de solución en la tabla (2). Se puede ver también que la desviación estándar y el coeficiente de variación son altos en los ocho conejos administrados con idéntica dosis de endotoxina. El estudio por HIMA reportó que la prueba de pirógenos en conejo conducido por doce laboratorios solo cuatro pasaron un nivel de endotoxina de 2.5 ng. por Kilogramo de peso.

La sensibilidad del bioensayo en conejo para endotoxina se encuentra en un rango de 1 a 10 ng./Kg. Greisman y Hornick encontraron la dosis umbral pirógenica para endotoxina de E. coli en conejos y humanos de 1.0 ng./Kg. de peso. Esto lleva a que no se tome en cuenta el volumen de una solución pirógenica administrada porque la respuesta del conejo a los pirógenos depende de la dosis (más bien la concentración) y no del volumen.

La sensibilidad del conejo a la endotoxina varía con el tiempo del día (circadiano) y el tiempo del año (circular). El mayor incremento de temperatura en la prueba para cualquier dosis dada de endotoxina ocurre en las tardes mientras que el menor incremento es a la media noche. Sin embargo en este caso la mayor sensibilidad fue vista a media noche al final de Octubre, mientras que la menor fue vista al final de Abril. Como esto fue contrario a las 10:00 a.m. y prácticamente no en todos, por lo que en el reporte fue sugerido que en una colonia de conejos sea probado su umbral de sensibilidad cada mes y en las horas cuando los productos serán probados normalmente. Así se controlara la variabilidad por la estación del año.

5.9 Interferencias en la prueba

Muchos productos administrados parenteralmente no pueden ser probados para pirógenos con la prueba de conejo por la interferencia que estos crean en la respuesta del conejo como pirógenica. Cualquier producto con un efecto pirético, las

prostaglandinas y agentes quimioterapicos de cáncer, interferirán con la respuesta en el conejo. Varios productos son inherentemente tóxicos a el conejo ver tabla(3) y deben ser diluidos a una concentración por debajo de la dosis efectiva farmacológica del fármaco.(4)

Tabla (3) Ejemplos de fármacos y productos farmacéuticos no adecuados para prueba de pirógenos USP.(4)

- 1.- La mayoría de agentes quimioterapicos de cáncer
- 2.- La mayoría de anestésicos, relajantes musculares y sedantes.
- 3.- Betametasona estéril, solución de fosfato de sodio
- 4.- Clorfeniramina inyectable
- 5.- Sulfato de magnesio
- 6.- Ioduro de metacurin inyectable
- 7.- Perfenazina
- 8.- Tiopental sodio inyectable

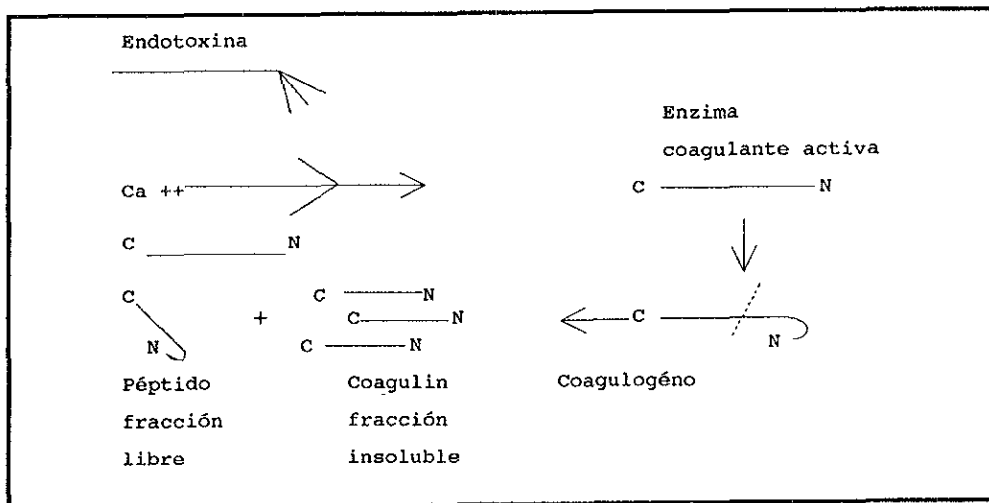
CAPITULO 6

APLICACION DE LA PRUEBA DE LAL EN PRODUCTOS FARMACEUTICOS
INYECTABLES

6.1 Introducción

Cooper fue el primero en describir el método y materiales requeridos para realizar correctamente la prueba de LAL para pirógenos.(4) La prueba de LAL es relativamente un procedimiento sencillo, especialmente cuando es comparado con la prueba de pirógenos en conejo de la USP.

El mecanismo biológico del proceso de gelificación del LAL es descrito como: La procoagulasa (proenzima) se activa en presencia de endotoxina o de un preparado de lípido A. Los cationes divalentes Ca^{+2} y Mg^{+2} son necesarios para la activación.(11)



Fig(5) Representación esquemática del mecanismo de reacción del lisado de amebocito de limulus (LAL).

La proenzima activada esta relacionada con las proteasa de serina contenida en la enzima de trombina, tripsina y factor A, (11) subsecuentemente reacciona con una fracción de proteína de bajo peso molecular (19,000-25,000) contenidos también en el lisado de amebocito de limulus. La fracción de bajo peso molecular, llamado coagulogéno, es dividido por la proenzima activa en una subunidad soluble y otra insoluble. La subunidad insoluble aparece como un coágulo solido, un precipitado, o una solución turbia dependiendo de la cantidad de coagulogéno insoluble. como se muestra en la fig. (5). La prueba consiste básicamente en un volumen de 0.1 ml. de solución de prueba con un volumen igual de lisado en tubo de prueba de 10 X 75 mm. despirógénizado. La mezcla es entonces agitada cuidadosamente e incubada a 37°C por una hora. Si el coágulo es solido y permanece cuando se invierte el tubo de prueba a 180°, la prueba se da como positiva.(4)

6.2 Condiciones Preliminares

1. Técnicas estrictas de asepsia deberán ser usadas para evitar contaminación microbial mientras es conducida la prueba.
2. Todos los contenedores y equipo usados deberán ser libres de pirógenos. Se tendrá que despirogenizar contenedores y equipo calentando a 250°C por cerca de 60 min.
3. Todo material de vidrio deberá ser lavado con detergente es antes de despirogenizar por calor seco. Si el detergente no es completamente retirado por enjuagues, este podría interferir con la reacción y causar un resultado falso negativo.
4. tomando precauciones en la reconstitución y almacenamiento del reactivo de prueba.

No almacenar endotoxina diluida para uso en la determinación de la sensibilidad de LAL porque pierde actividad por adsorció en la superficie del frasco.

La vida media del reactivo de LA es de cuatro semanas en

congelación después de reconstituido.(4)

6.3 Determinación de endotoxina límite

La endotoxina límite (EL) es la máxima cantidad de endotoxina en EU/ mg. administrada en una materia prima destinada a la preparación de una solución parenteral y se calcula de la siguiente forma:

$$EL = \frac{K}{M}$$

Donde:

K = la cantidad máxima de endotoxina en EU/Kg. que un paciente puede recibir sin que se produzca una reacción febril. Su valor para una indicación administrada por vía intravenosa se fija en 5 EU/Kg.

M = es la dosis máxima expresada en mg. por Kg. de peso corporal que se aconseja administrar en una hora. Se considera que el peso de un adulto es de 70 Kg.

6.4 Determinación de la máxima dilución válida

MVD. es el factor de dilución límite para la preparación que hace valido el test de endotoxina o sea es la máxima dilución de un producto en la cual se puede detectar la endotoxina límite. Es evidente que este factor depende de la sensibilidad del reactivo de LAL utilizado. Se calcula según la siguiente operación:

$$MVD = \frac{EL \times P}{\lambda}$$

Donde:

EL = límite de endotoxina (EU/mg.) o (EU/UI)

P = la concentración (mg./ml.) o (UI/ml.) del fármaco o de la solución a probar de acuerdo a las instrucciones de marbete.

λ = sensibilidad del lisado (EU/ml.)(13)

6.5 Validación de la prueba de LAL

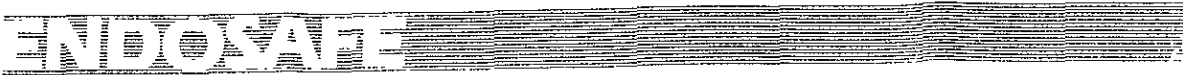
Para validar el uso de la prueba de LAL en cualquier aplicación se requiere de dos determinaciones: a) la sensibilidad del lisado y b) Prueba de compatibilidad a través de las propiedades de inhibición o realce del producto.(10)

6.5.1 Confirmación de la sensibilidad del reactivo LAL.

Para confirmar la sensibilidad de marbete del reactivo de LAL. Se prepara una serie de diluciones dobles de endotoxina referencia estándar (RSE) o endotoxina control estándar (CSE) en concentración 2λ , λ , 0.5λ , 0.25λ . donde λ es la sensibilidad de marbete del reactivo de LAL en unidades de endotoxina por mililitro. Llevar a cabo la prueba en las cuatro concentraciones estándar por cuadruplicado incluyendo un control positivo y uno negativo. La sensibilidad es calculada por la determinación de la media geométrica de el punto final. La media geométrica deberá estar entre el rango de $0.5\lambda-2\lambda$ según USP XXIII.(10)

6.5.1.1. Cálculo de la media geométrica

El punto final es la última dilución, la cual presenta una respuesta positiva en el ensayo. Este ensayo se realiza a través de una serie de diluciones dobles decrecientes de la muestra donde se sospecha la presencia de endotoxina o de una muestra cargada con endotoxina.



CERTIFICATE OF ANALYSIS
For Control Standard Endotoxin

VIAL CONTENTS:

EndosafeTM Control Standard Endotoxin is prepared from E. Coli strain 055: B5. Each vial contains 500 ng. of purified Lipopolysaccharide, freeze dried in a stabilized matrix.

DIRECTIONS FOR USE:

Reconstitute and dilute the lyophilized material with LAL reagent grade water. Vortex mix vigorously for at least 5 minutes after rehydration, and for at least one minute immediately prior to each use. Prepare a dilution series for use as LAL controls according to the scheme shown below.

STORAGE:

Store rehydrated material at 2-8°C. for up to four weeks. Store lyophilized material at controlled room temperature or refrigerated as preferred. Diluted endotoxin should not be stored for longer than one week except under validated conditions
DO NOT FREEZE ENDOTOXIN SOLUTIONS.

CSE/RSE RATIO

The potency of this standard in Endotoxin units, (EU) has been determined to be 10 EU/ng by the method prescribed in Appendix C, page 19 of the GUIDELINE ON VALIDATION OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST AS AN END PRODUCT ENDOTOXIN TEST FOR HUMAN AND ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS AND MEDICAL DEVICES, published by the U.S. Food and Drug Administration.

CSE LOT No. E07 LAL REAGENT LOT No. 9G9 RSE LOT No. EC-5

Geometric Mean Sensitivity with RSE = 0.125 EU/ml
Geometric Mean Sensitivity with CSE = 0.0125 ng/ml
RSE/CSE Ratio of Geometric Means = 10 EU/ng
Vial contents = 500ng/vial x 10 EU/ng = 5,000 EU/vial

Signed [Signature] Date 8/14/91

RECOMMENDED DILUTION SCHEME FOR CONTROL STANDARDS:

Beginning with the stock vial of endotoxin, which contains 5,000 EU, rehydrate with 5.0 ml of LAL reagent water to get a stock solution of 1,000 EU/ml. Then prepare serial dilutions by the scheme below to at least 1/2λ. Vortex mix at each dilution step for 30 seconds prior to preparing the next dilution.

Dilution:	Concentration: (EU/ml)
1st. 1:10	100
2nd. 1:10	10
3rd. 1:10	1
4th 1:2	0.5
5th 1:2	0.25
6th 1:2	0.125
7th 1:2	0.0625
8th 1:2	0.03125

Después se registra el punto final (E) en cada réplica de la serie de diluciones. En seguida se determina el log. del punto final (e) en cada réplica. Entonces se calcula la media geométrica del antilógaritmo de la división de la suma de los logaritmos del punto final entre el número de réplicas como se indica en el siguiente ejemplo tabla (5). También se da un ejemplo de como se verifica la sensibilidad del reactivo LAL. Los datos se toman del certificado de análisis fig.(6).(10)

TABLA (4) ejemplo de los resultados de verificación de la sensibilidad del reactivo LAL lote No. 9G9 donde su sensibilidad es de 0.125 UE/ml. (λ) según marbete.

Réplica (f)	Resultados del ensayo de coagulación diluciones de endotoxina (EU/ml.)					punto final (E)
	1	0.5	0.25	0.125	0.06	
1	+	+	+	+	-	0.125
2	+	+	+	+	-	0.125
3	+	+	+	+	-	0.125
4	+	+	+	+	-	0.125

TABLA (5) Cálculo de la media geométrica en el punto final

Punto (EU/ml.)	final	log ₁₀ del punto final
0.125		-0.093
0.125		-0.093
0.125		-0.093
0.125		<u>-0.093</u>
		-3.612

$$\begin{aligned}
 \text{La media geométrica del punto final} &= \text{antilog } \frac{\sum e}{f} \\
 &= \text{antilog } -3.612/4 \\
 &= \underline{0.125 \text{ EU/ml.}}
 \end{aligned}$$

Como el cociente de dividir la media geométrica de la sensibilidad de la endotoxina referencia estándar entre la media geométrica de la sensibilidad del reactivo de Limulus es λ . Este resultado se acepta como válido para la verificación del reactivo de LAL porque está dentro del rango de 0.5λ - 2.0λ .

6.5.2 Prueba de compatibilidad

El objetivo de esta prueba es demostrar que el producto o diluciones del producto se encuentran por debajo de la máxima dilución válida y no presenta interferencia de inhibición o realce con el lisado.

La prueba se realiza en muestra o en dilución de la muestra que no exceda la máxima dilución válida. Por lo que se prepara una serie de diluciones dobles de muestra y muestra cargada con endotoxina (CSE) en concentración de 2.0λ , λ , 0.5λ y 0.25λ por cuadruplicado para cada nivel de la serie de diluciones. Además por duplicado correr en paralelo una serie de diluciones de endotoxina en agua con las cuatro concentraciones estándar y como control negativo a agua apirogena. Calcular la media geométrica del punto final de la concentración de endotoxina como se describe en la tabla (5). La prueba es válida para el producto si la media geométrica del punto final se encuentra en el intervalo de 0.5λ - 2.0λ según USP XXIII.

Sí el resultado obtenido para la muestra que contiene endotoxina se encuentra fuera de los límites de especificación

USP XXIII, el producto es inadecuado para la prueba de endotoxina bacteriana.

Repetir la prueba de inhibición o realce después de neutralizar, inactivar, remover sustancias de interferencia o por dilución que no exceda la máxima dilución válida. luego a través de subsecuentes ensayos para endotoxina y utilizando una dilución que no exceda la máxima dilución válida llegar al punto donde no presenta inhibición o realce.

Sí se encuentra presente endotoxina endógena en alguna muestra bajo condiciones de prueba. La muestra debe primero ser tratada removiendo la endotoxina presente por ultrafiltración o por una dilución apropiada. Diluir la muestra (como sí se reconstituyera para su aplicación o uso) cuyo nivel no exceda a la máxima dilución válida. Entonces repetir la prueba de inhibición o realce tomando en cuenta la máxima dilución válida.

6.5.2.1 Cálculo del contenido de endotoxina

Para calcular la concentración de endotoxina (en UE/ml. o UE por gramo o mg.) del artículo bajo prueba :

- 1.- obtener la concentración del punto final (E) para cada serie de diluciones.
- 2.- sacar logaritmo a las concentraciones del punto final (e)
- 3.- Obtener la concentración de endotoxina a través del cálculo de la media geométrica del punto final.(10)

En seguida se da un ejemplo de como realizar el cálculo para determinar la cantidad de endotoxina en una muestra bajo prueba.

Tabla(6) Ejemplo de los resultados de la prueba de compatibilidad para producto X. donde la sensibilidad del lisado es de 0.125 EU/ml. lote 12-42-634 y endotoxina lote 65.

Resultados de endotoxina en agua

0.25 EU/ml.	0.125 EU/ml.	0.06 EU/ml.	0.03 EU/ml.	0.0 EU/ml.
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

Tabla(7) Resultados de la dilución 1/14 de producto X en Carbonato de potasio.

0.25EU/ml.	0.125EU/ml	0.06EU/ml.	0.03EU/ml.	0.0 EU/ml.
+	+	-	-	-
+	+	+	-	-
+	+	+	-	-
+	+	-	-	-

Determinación del logaritmo de la concentración del punto final.

REPLICA	Conc. en el punto final (E)	log ₁₀ del (e)
1	0.125 EU/ml.	-0.903
2	0.06 EU/ml.	-1.222
3	0.06 EU/ml.	-1.222
4	0.125 EU/ml.	-0.903

6.5.2.2 Cálculo de la media geométrica para producto X:

Fórmula:

$$\begin{aligned} \text{La media geométrica del punto final} &= \text{antilog } \frac{\sum e}{f} \\ &= \text{antilog } -4.25/4 \\ &= \underline{0.086 \text{ EU/ml.}} \end{aligned}$$

Luego como el cociente entre la media geométrica de endotoxina en agua y la media geométrica de la solución de producto X, 1/14 es 1.45λ. Este resultado se acepta como válido ya que está comprendido dentro del rango de aceptación USP XXIII que es de 0.5λ -2.0λ. (13) (10)

6.6 Requerimientos para validar la prueba de LAL.

Hay varios requerimientos en el procedimiento para validar la prueba de LAL:

1. Usar un control positivo y uno negativo en la prueba de LAL.
2. Usar la mayor y la menor concentración del producto farmacéutico sensible en tres o más concentraciones.
3. El uso de tres lotes de cada concentración del fármaco para la validación de la prueba.
4. Sí cambia de fabricante de lisado, la validación de la prueba deberá repetirse al menos con una unidad del producto.
5. El reactivo de LAL deberá tener una sensibilidad mínima 0.25 EU/ml.
6. La endotoxina control deberá siempre ser referido a la RSE.
7. Cualquier cambio en la formulación del producto, proceso de manufactura, fuente de ingredientes en la formulación, o

lote de lisado necesita una revalidación de la prueba de LAL para el producto.(4)

6.7 Diferentes métodos para determinar la prueba de LAL

6.7.1 Método del punto final de coagulación

El procedimiento más simple y más ampliamente usado para la determinación de endotoxina en solución es el del punto final de coagulación. Un volumen de 0.1 ml. de solución de prueba con un volumen igual de lisado son mezclados en un tubo de prueba de 10 X 75 mm. despirógenizado. La mezcla es entonces agitada cuidadosamente e incubada a 37°C por 1 hora, no tocar los tubos durante la incubación porque podría modificarse la prueba. El punto final es fácilmente leído, retirando los tubos cuidadosamente del baño e invirtiéndolos 180°. Si el coágulo es sólido y permanece sólido cuando se invierte el tubo. La solución de prueba es positiva para endotoxina. Cuando se usa de esta forma, el punto final de coagulación es principalmente una prueba de pasa o no pasa, limitada únicamente por la sensibilidad de el reactivo LAL empleado. Aunque esta sensibilidad puede ser usada para indicar cantidad. Así si una especificación interna de manufactura para niveles de endotoxina menores a la sensibilidad 0.625 ng./ml. para un producto en particular y el punto final de coagulación fue positivo con el lisado de esta sensibilidad, el producto no pasa.

Varios lisados comerciales con punto final estandarizado, están disponibles en el mercado, el ensayo puede también ser usado para cuantificar el nivel de endotoxina en una solución o producto en particular. Una serie de diluciones dobles de la solución de prueba son realizadas y el punto final de coagulación es determinado. El nivel de endotoxina es calculado multiplicando el recíproco de la máxima dilución de la solución de prueba dando un punto final positivo por la sensibilidad de la preparación del lisado. Por ejemplo si la sensibilidad del punto fue 1:16 la

concentración de endotoxina será $16 \times 0.010 = 0.16 \text{ ng./ml.}$ esto es lo más cercano y particularmente útil en monitoreo de materiales y agua en el procesos. Consiste de un control positivo de un producto cargado con una concentración conocida de endotoxina y un control negativo usando agua apirógena el cual puede ser usado en todas las pruebas que se realicen.(5)

6.7.2 Método turbidimétrico

Aunque el método del punto final de coagulación es el más utilizable de la prueba de LAL. El ensayo turbidimétrico de LAL da una medida cuantitativa de endotoxina sobre un rango de concentración. Ya que en el ensayo están implicados los datos de cualquier incremento en la concentración de endotoxina que responda a un incremento proporcional en la turbidez debido a la precipitación de proteína coagulable (coagulogéno) en el lisado. Así la densidad óptica de varias diluciones de la sustancia de prueba será leída contra una curva estándar obtenida al utilizar muestras de la sustancia de prueba cargada con cantidades de endotoxina conocida.(5)

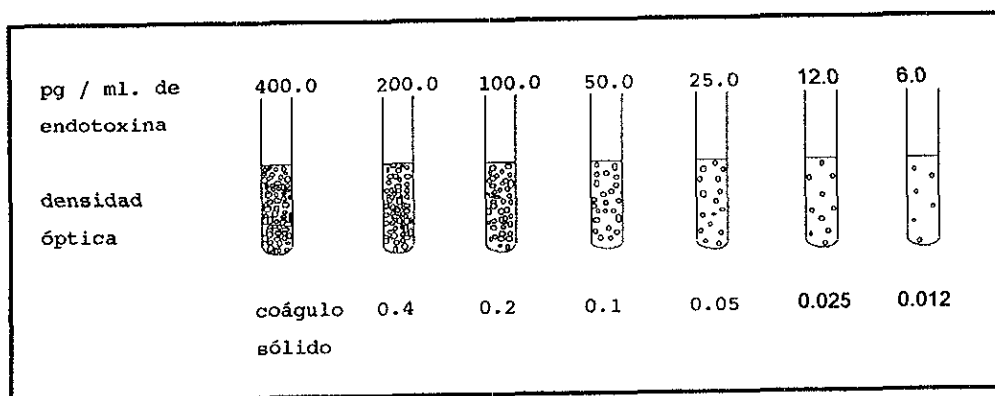


Fig. (7) densidad óptica de diferentes concentraciones de endotoxina

Esto llevara a pensar que la cuantificación de la endotoxina por el método turbidimétrico requiere que el lisado este diluido para prevenir la formación de coágulo.(5)

Así puede ser visto en la figura (7) la coagulación del punto final fue alcanzado a 400 pg/ml. porque el reactivo de LAL pudo detectar niveles de endotoxina a un rango de 6-200 pg/ml. de endotoxina. Aunque un solo punto de coagulación puede ser adecuado para realizar la prueba de rutina de varios productos farmacéuticos, el método tiene la habilidad de cuantificar endotoxina y es invaluable para cuestiones de pirógenos relativos a problemas de producción, el monitoreo diario de agua de la planta y pruebas de producto en proceso que pueden alertar al personal de producción de problemas severos de pirógenos antes de llegar a ser críticos. De esta forma La acción correctiva puede llevar a reducir la carga de pirógenos y niveles de endotoxina.

6.7.3 Método del sustrato cromogénico

El sustrato cromogénico es un polipéptido sintético con una secuencia de aminoácidos que simulan un sitio de desdoblamiento natural en la proteína coagulante (coagulogéno) en el lisado. Una parte de la p-nitroanilina (pNA) esta unida a la parte final del péptido Boc-Leu-Gly-Arg-PNA. Como en las otras pruebas también, un mililitro de muestra es adicionado a 0.1 ml. de reactivo toxicolor (una mezcla de lisado de amebocito y sustancia cromogénica) disuelto en 0.1 ml. de buffer Tris 0.4 mol/l y PH de 9, entonces la mezcla es incubada a 37°C por 30 min. se mide la absorvancia a 405 nm. La curva estándar para todas las soluciones, son graficadas. Aunque para esta prueba hay diferentes versiones en cuanto a la adición del sustrato cromogénico. En la que se describe arriba se hace una mezcla del reactivo LAL con el sustrato cromogénico y se adiciona a la muestra y en seguida se incuba por 30 min. La otra versión es: 0.1 ml. de muestra se adiciona 0.1 ml. de reactivo LAL se incuba durante una hora, se adiciona el sustrato cromogénico se vuelve a

incubar por 6 min. y entonces se toman las lecturas espectrofotométricas. (5) (14)

6.7.4 Método colorimétrico de Lowry

La densidad óptica de la proteína de Lowry ofrece todas las ventajas de una prueba cuantitativa para endotoxina, semejante al método turbidimétrico. El método se basa en la cuantificación de proteína lisada (coagulogéno) por la endotoxina. Se ha observado que a mayor cantidad de endotoxina habrá mayor cantidad de proteína lisada. Así la cantidad de proteína lisada (coagulogéno) se precipita, y entonces puede ser cuantificada realizando una determinación de proteína de Lowry.

Como se llevo acabo con el otro método, volúmenes iguales de muestra de prueba y lisado (0.1 ml.) son mezclados en tubos de 10 X 75 mm. libres de pirógenos. Estos tubos son incubados a 37°C por una hora y en seguida se centrifugan a 1375 X g por 10 minutos.

El sobrenadante es retirado de la proteína precipitada. Entonces la cantidad de proteína es determinada por densidad óptica. (5)

6.8 Limitaciones

6.8.1 Especificidad de la prueba

La prueba de LAL solo detecta endotoxina de bacterias gram negativo.

6.8.2 Condiciones de Análisis

- ▣ El de la mezcla de muestra y reactivo LAL deberán presentar un rango entre 6-8.
- ▣ La muestra no deberá presentar una osmolalidad y fuerza iónica alta

- ▣ La muestra no deberá contener cationes dibivalentes como calcio o magnesio ya que puede inhibir la formación del coágulo.
- ▣ Evitar una agitación fuerte al realizar la mezcla entre la solución de muestra y el reactivo LAL.

6.9 Ventajas

6.9.1 Facilidad de uso

La prueba de LAL en si es simple, no requiere de grandes espacios para su realización, se ocupa un mínimo de personal así mismo de material. Como es una prueba in vitro no requiere de un animal vivo.

6.9.2 Sensibilidad

La prueba de LAL posee una sensibilidad de 10 veces más comparado con la prueba de pirógenos en conejo. También permite determinar una sensibilidad de hasta 0.125 EU/ml. y el método cinético cuantitativo tiene una sensibilidad de 0.01 a 0.001 EU/ml.

6.9.3 Reproducibilidad

La prueba de LAL es altamente reproducible después de validar la técnica.

6.9.4 Costo

El costo de la prueba de LAL es tres veces menos que la prueba de pirógenos en conejo. (11)

CAPITULO 7

ESTUDIOS DE LA APLICACION DE LA PRUEBA DE LAL

7.1 Aplicación de la prueba de LAL en ciprofloxacina

La ciprofloxacina es un antibiótico derivado de la 4-quinona. Esta indicada para el tratamiento de diversas infecciones causadas por bacterias sensibles a este antibiótico.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología para determinar endotoxinas por el método del punto final de la prueba de LAL en una solución parenteral de ciprofloxacina. Las distintas etapas de este desarrollo fueron:

- 1.- Elección de la endotoxina límite (EL)
- 2.- Determinar la máxima dilución válida (MVD).
- 3.- Validar el ensayo de detección de endotoxinas bacterianas.

7.1.1 Resultados

- EL = 0.88 EU/mg.
- MDV = 1:14 para lisado de sensibilidad 0.125 EU/ml.
- MVD = 1:28 para lisado de sensibilidad 0.06 EU/ml.
- Se utilizaron dos marcas de reactivo LAL y endotoxina como sigue:
 - Lisado A sensibilidad de 0.125 EU/ml. lote 12-42-634 y endotoxina lote 65.
 - Lisado A sensibilidad de 0.06 EU/ml. lote 12-53-645 y endotoxina lote 62.
 - Lisado B sensibilidad de 0.125 EU/ml. lote J481X y endotoxina lote E18.

- ▣ Lisado B sensibilidad de 0.06 EU/ml. lote H196L y endotoxina lote E17.
- ▣ Comprobaron que presenta un efecto inhibitor sobre la formación del coágulo.
- ▣ Para descartar la posible acción inhibitoria del recipiente contenedor para ciprofloxacina se probó un extractivo del mismo. No se observo interferencia negativa con el lisado.
- ▣ Se realizaron tres tipos de experiencias para superar el efecto inhibitor de la Ciprofloxacina 1) por dilución; 2) por neutralización, 3) Agregando sales.
- ▣ Con los reactivos A consiguieron levantar la inhibición mediante el agregado de sales.
- ▣ Con los reactivos B levantaron la inhibición utilizando diluciones del producto.
- ▣ Para los reactivos A proponen como diluciones de trabajo, las diluciones 1/10 y 1/20 para una sensibilidad de 0.125 EU/ml. y 0.06 EU/ml. respectivamente. En ambos casos reemplazaron el agua por solución de carbonato de potasio 1 mM como diluyente.
- ▣ La dilución de trabajo que proponen para los reactivos B es de 1/20 para una sensibilidad 0.06 EU/ml.

En resumen él autor dice que hasta ese momento no se había descrito la aplicación de la prueba de LAL para productos parenterales como Ciprofloxacina. La aplicación directa del método muestra fuerte inhibición en el proceso de formación del coágulo. Por lo que en este trabajo proponen un valor de endotoxina límite (EL) e investigan diferentes alternativas para superar la interferencia del fármaco en el ensayo.(8)

7.2 Corrección del PH con ácidos y bases débiles en el ensayo de piretógenos por el Limulus Test

En esta referencia se estudia la aplicación de la prueba de Limulus para detección de endotoxina bacteriana en productos

farmacéuticos en función del ajuste del PH incorrecto de la mezcla de muestra-reactivo LAL que produce la no formación del gel en caso de presencia de endotoxina.

Por eso, durante la validación de un producto hay que probar si hay inhibición de la reacción por falta de un PH adecuado (6.0-7.5). Para solucionar el problema de aquellos productos cuyos PHs interfieren en la reacción, es necesario realizar un ajuste del PH. Según la USP XXII, se puede realizar mediante dos procedimientos: 1) Agregando cantidades adecuadas de solución de hidróxido de sodio y de ácido clorhídrico. 2) ajuste del PH con buffers adecuados.

La utilización de ácidos y bases fuertes (NaOH y ClH), producen cjunto con los componentes de los inyectables , interferencias químicas en el ensayo. Por otra parte, el uso de buffer (TRIS-ClH), no permite ajustar los PHs extremadamente ácidos o alcalinos.

Las soluciones de prueba para este estudio son: Solución de 5-Fluoruracilo 50 mg/ml, solución de Ibuprofen Lisinato 80 mg/ml y Ciclonium bromuro 5mg/ml, solución de Ciprofloxacina base 2 mg/ml, solución de succinilcolina clorhidrato 50 mg/ml, solución de Ibuprofen lisinato 136.5 mg/ml y Vitamina B12 2 mg/ml.

7.2.1 El objetivo de este trabajo es: demostrar que el uso de soluciones de bicarbonato de sodio 1% y de soluciones de ácido acético 0.1% y 1%, se puede generalizar a todos los productos farmacéuticos porque las soluciones de bicarbonato y ácido acético permiten ajustar PHs ácidos y alcalinos sin producir interferencia en la reacción de limulus.

7.2.2 La conclusión de los resultados son: El autor concluye que las soluciones de ácido acético al 0.1% , 1% y la solución de bicarbonato de sodio al 1%, permiten corregir los PHs ácidos y alcalinos de los productos farmacéuticos, sin producir inhibición de la reacción de la prueba de Limulus, ni reacciones químicas

con los componentes de los productos, que puedan interferir con la formación del gel. (15)

7.3 Sustitución de la prueba de pirógenos en conejo por la prueba de LAL.

Algunos laboratorios han reemplazado la prueba de pirógenos en conejo por la prueba de LAL para endotoxina bacteriana, al parecer por dos razones: 1) la simplicidad del método, 2) mayor sensibilidad. La desventaja con la prueba de pirógenos en conejo es que se requiere del factor animal, un sistema de control de temperatura, material estéril y 5 horas de trabajo, la sensibilidad de la prueba esta limitada por la cantidad máxima de 10 ml. de solución/Kg. de conejo.

Al realizar el estudio de reemplazo los autores encontraron que: En cuanto a la reglamentación la prueba de LAL para endotoxina bacteriana solo se encuentra reportada para agua inyectable y no para otros productos inyectables, solo aparecen propuestas las guías de aplicación en las farmacopeas europeas.

7.3.1 plantearon cuales son las causas para que un producto farmacéutico sea pirógeno y dieron lo siguiente:

7.3.1.1 Endotoxina la presencia de bacterias productoras de lipopolisacárido la causa más importante de pirogenicidad en las soluciones inyectables, las bacterias gram negativas son capaces de liberar ciertos lipopolisacárido por alteración o por lisado de pared.

A saber existen dos formas para controlar la respuesta pirógena a) la sensibilidad del organismo humano (o del conejo) a la endotoxina ésta es de 5 UE/Kg./h. o sea 0.5 UE/ml. para una solución perfundida a un hombre de 50 Kg.; se han propuesto estándares diferentes para los productos susceptibles de ser inyectados por vía intratecal. b) La eficacia del tratamiento térmico de esterilización que es capaz de reducir a un factor de

la cantidad presente de endotoxina (el autoclave de un factor esterilizador de 10 a 12 min.).

7.3.1.2 Proteínas pirógenas no endotóxicas: Son cada vez más conocidas. Las más notables son las proteínas poco termolabiles. Estas son secretadas por las bacterias y no necesitan de lisado para ser liberadas. Las enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, TSST (toxina del síndrome del shock tóxico), igualmente la exotoxina de *Staphylococcus piogenes* y la exoenzima **S** de *Pseudomona aeruginosa*.

7.3.1.3 Los pirógenos no proteolíticos no endotóxicos: Estos son los elementos de la pared de las bacterias gram positivo. realmente la presencia de estas bacterias en la circulación sanguínea causan los shocks sépticos semejantes a aquellos provocados por las gram negativo. Estas observaciones son recientes y ha sido demostrado que las mismas citoquinas (TNF α Y IL6) son liberadas después de estimulación similar a las endotoxinas con los mismos efectos fisiológicos. Los elementos causales de la reacción son los fragmentos del peptidoglicán y el ácido teicoico. se a observado en particular que la inyección de estos es semejante a la inyección de endotoxina en un animal de prueba.

7.3.2 Planteamiento de protocolos

Entonces para ser usada la prueba de LAL para endotoxina bacteriana en la farmacia central de hospitales plantearon un protocolo con los siguientes puntos: 1) deberá ser rechazado un producto sí antes de ser esterilizado presenta un cierto número de microorganismos para evitar la cantidad de pirógenos que provoquen una respuesta indeseable. 2) La validación por comparación del ensayo en conejo es evidentemente incapaz de garantizar esta comparación. De acuerdo a estos puntos la

proposición de un segundo protocolo de control para garantizar la ausencia de reacciones pirógenicas como sigue:

a). la contaminación antes de esterilizar el producto deberá ser ≤ 5 gérmenes mesofilos/ml.

b). El resultado de la prueba de LAL del producto sin esterilizar deberá ser ≤ 5 UE/ml. (Norma teniendo en cuenta una inactivación de esterilización por un factor de 10 a 20).

c). El resultado de la prueba de LAL del producto esteril deberá ser ≤ 0.25 UE/ml.

d). Ausencia de bacterias y pirógenos de componentes de endotoxinas (Staphylococcus áureas, Pseudomona aeruginosa o de un hongo), en este planteamiento el valor de su estándar es relativamente alto para los puntos a y b, pues varios laboratorios han preferido ser más estrictos sobre la contaminación inicial para evitar la determinación de los gérmenes específicos:

a). Contaminación de productos sin esterilizar ≤ 10 gérmenes mesofilos /100 ml.

b). LAL para productos sin esterilizar ≤ 0.25 UE/ml. o 0.01 UE/ml. (algunos laboratorios americanos).

c). LAL para producto estéril ≤ 0.25 UE/ml.

No tomaron importancia a Streptococcus pyogenes porque esta especie no sobrevive en el entorno. En cambio practicaron la búsqueda de hongos que han sido descritos como pirógenos en las antiguas obras galénicas sin que los constituyentes responsables hayan sido identificados.

7.3.3 Conclusiones

La conclusiones fueron: La sustitución de la prueba de pirógenos en conejo por la prueba de LAL para endotoxina va más allá de la simple prueba de LAL y que no se mejora la carga de

trabajo solo hay una mejora de la seguridad de calidad por lo que no es aceptable reemplazar la prueba de pirógenos en conejo por la prueba de LAL para endotoxina. Además el autor sugiere que convendría tomar en cuenta los nuevos sistemas de control de temperatura en conejos y la gestión de informática. Pero que es bueno tomar en cuenta la prueba de LAL porque es un progreso reciente. Por último el ensayo de LAL solo puede ser un método alternativo a la de pirógenos en conejo.(2)

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

8.1 Uno de los objetivos, al realizar este trabajo de "Farmacia Hospitalaria y Comunitaria". Sobre la aplicación de la prueba de Lisado de Amebocito de Limulus en productos farmacéuticos inyectables es: difundir a la comunidad de Químicos Farmacéuticos Biólogos la prueba de LAL para detectar endotoxina bacteriana. ya que esta prueba podría ser aplicada para control de calidad en mezclas intravenosas, en algún producto farmacéutico como radiofármacos, antipiréticos, hormonas donde la prueba de pirógenos en conejo esta limitada. También es posible aplicar esta prueba a fármacos que producen un efecto tóxico en el conejo.

8.2 Al realizar la descripción de la aplicación de la prueba de LAL se concluye que:

8.2.1 La prueba de LAL es diez veces más sensible que la prueba de pirógenos en conejo.

8.2.2 El proceso de la prueba de LAL es menos laborioso ya que como es una prueba in vitro no es necesario un animal vivo. Por lo tanto no requiere de un espacio amplio para realizar la prueba y solo requiere de un mínimo de personal.

8.2.3 Con lo que se refiere al costo, según bibliografía es tres veces menor comparado con la prueba en conejos.

8.2.4 El tiempo de prueba es de aproximadamente 5 veces menos a la prueba de pirógenos en conejo.

8.2.5 Los requerimientos para material e instalaciones, en ambos métodos son semejantes pues se requiere de material

despirógenizado y una área aséptica así como diluyente libre de pirógenos.

8.2.6 En cuanto a las limitaciones de la prueba de LAL, la de mayor importancia es la referente a su especificidad, debido a que solo detecta endotoxina de bacterias gram negativas. Esta desventaja de la prueba de LAL hace que garantice la ausencia de endotoxina de bacterias gram negativas pero en el proceso de fabricación, el fármaco pudiera ser contaminado de pirógenos de diferente origen. Esto implicaría hacer una prueba más para detectar pirógenos no relativos a las bacterias gram negativas o siendo más estrictos con las Buenas practicas de manufactura, para evitar la presencia de los pirógenos no relacionados con las bacterias gram negativo.

Las condiciones de análisis, es otra de las limitaciones debido a que el PH de la mezcla entre el reactivo de LAL y la muestra bajo prueba deberá estar entre 6-8; la muestra no deberá contener cationes divalentes como calcio o magnesio ya que puede inhibir la formación del coágulo.

Otra de las limitaciones es: Algunos fármacos, presentan efectos de inhibición o realce en la prueba por lo que antes de aplicarla a un producto parenteral o monitoreo de material aséptico, o monitoreo en el proceso de fabricación de productos parenterales la prueba de LAL deberá ser validada para asegurar que la prueba de LAL esta realmente detectando endotoxina bacteriana.

8.2.7 Aunque en la farmacopea y la USP XXIII no se encuentra la aplicación de la prueba de LAL para detección de endotoxina bacteriana para productos farmacéuticos inyectables. La industria farmacéutica esta empezando a utilizar esta prueba de rutina en fármacos parenterales, tal es el caso de la Ciprofloxacina en la que se esta estudiando la posibilidad de ser aplicada.

8.2.8 La prueba de LAL además de ser aplicada en fármacos inyectables, también es de gran utilidad en, el monitoreo del proceso de fabricación de los inyectable, en el agua para inyectables, en la detección de endotoxina para validación de ciclos de esterilidad de un autoclave entre otras.

8.2.9 Aunque la prueba de pirógenos en conejo es la prueba oficial de control de calidad para productos parenterales. La prueba de LAL viene a ser una prueba alterna para garantizar la calidad de los productos farmacéuticos inyectable.

CAPITULO 9

BIBLIOGRAFÍA

1. Blanca L. Cejudo Uribe y Ma. de Lourdes Garzón Serra, "Control Biológico para Productos Farmacéuticos". Departamento de Sistemas Biológicos División de C.B.S. UAM Xochimilco pgs. 11-13 1993.
2. J.C. Darbord, C. Dumartin et C. Facorat, "Remplacement de l'essai sur lapin pour la recherche des substances pyrogènes par l'essai LAL de détection des endotoxines bactériennes". Pharmacie Centrale des hôpitaux, Paris. S.T.P. Pharma Pratiques 4:484-486 (6) 1994.
3. J. Mundell and K.A. Frizelle "An introduction to the Limulus Test for Endotoxin (Pyrogens)". Steri Lab. Serv. Fohennesborg India. Pharma times 25:5-7 1993.
4. Michael J. Akers, "Parenteral Quality Control", (Sterility, pyrogen, particulate, and package integrity Testing), Center for Health Sciences University of Wisconsin Madison, Wisconsin. pag. 79,93-97,99,101,103 y 109. 1985.
5. Frederick C. Pearson, III "Pyrogens", Endotoxins, LAL Testing, and depyrogenation Travenol Laboratories, In. Morton Grove, Illinois. USA pgs. 11-23,120-125, 127-129; 1985.
6. Graciela Vazquez Barroso, Tesis Profesional "Revisión Bibliográfica Sobre Pirógenos, UNAM, MEXICO, pg. 4; 1979.

7. Ana María López Campos, Tesis Profesional, "Prueba de Limulus: Una alternativa a la prueba de determinación de pirógenos en conejo, discusión de su aplicación para Valoración Cuantitativa". UNAM MEXICO Capítulo II, 1987.
8. Richard B. Prior, Ph. D. "Clinical applicationa of the Limulus Amebocyte Lysate Test" Columbus Ohio USA. pas. 4-7; 1990
9. Ernest Theodor Rietschel and Helmut Brade "Bacterial Endotoxins", An integral part of many bacteria, these molecules are at once brutal and benefical to humans. Efforts are under way to block the bad effects and harness the goog Scientific Americans pgs. 26-33; 1992.
10. The United States Pharmacopeia The National Formulary (USP 23) USA., Pgs.1696,1697,1718. 1995.
11. Mazaud.P., Boulay N. "Essai des endotoxines bactériennes par le test au lysat d'amebocito de limule", Service Pharmacie Centre Hospitalies) La Pharmacie Hospitaliese Francaise, 106,251-259. 1993.
12. James F. Cooper and Michael E. Neely, "Validation of the LAL Test for end-product Evaluation", Pharmaceutical Tecnology 1980.
13. Loira R., Giorgi, A. and Rotuno C. "Aplicación del LAL Test para Determinación del nivel de Endotoxina en solución parenteral de Ciprofloxacina", Sabybi (35) 54-63 Argentina 1996.

NO DEBE
SER
SALVADA
BIBLIOTECA

14. Morteza Refree-Tehrani and Habibeh Khoshbooi,
"Inhibiting Effect of various cations on Endotoxin Assay
with the Limulus Amebocyte Lysate Chromogenic Substrate
Metod". Industrial Pharmacy, Tehran University of Medical
Sciences, Tehran (Iran). Pharm Ind. 58, 1042-1045; 1996.

15. Muñoz, Laura C. "Corrección del PH con ácidos y bases
debiles en el ensayo de Piretógenos por el Limulus Test
Safybi 33:50-55 Argentina 1994