



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TRABAJO PROFESIONAL

MODALIDAD:
CONSTATACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

ITZIAR VARGAS BELLO PÉREZ

NÚMERO DE CUENTA: 09934775-8



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

DEDICATORIA

A mis papás y hermano

A Odín y Milky

A ti

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A mi facultad

A todos en la UCPQByB

Al Laboratorio de Investigación y Asistencia Técnica "F. Ernesto Favela Álvarez"
de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional

Al Laboratorio de Control de Calidad Fisicoquímico y Biológico y Bioterio del
Departamento de Control de Calidad de Intervet México, S.A de C.V. Sitio
Santiago Tianguistenco, Estado de México.

Al MVZ Julio César Sánchez Lemus

A los miembros del Jurado

A mis amigos

ÍNDICE

I. REPORTE DE ACTIVIDADES

	Página
1. Introducción.....	1
2. Objetivo.....	2
3. Actividades Realizadas.....	3
3.1. Unidad de Constatación de Productos Químico-Biológicos y Bioterio (UCPQByB).....	3
3.1.1 Área de producción.....	4
3.1.1.1 Actividades realizadas.....	4
▪ Condiciones ambientales.....	4
▪ Alimentación de los animales.....	5
▪ Limpieza y desinfección.....	6
▪ Manejo general de los animales.....	6
▪ Reproducción de ratones.....	7
▪ Reproducción de cuyos.....	9
3.1.2 Área de pruebas.....	10
3.1.2.1 Actividades realizadas.....	10
▪ Realización general de pruebas.....	10
▪ Condiciones ambientales.....	11
▪ Limpieza y desinfección.....	11
▪ Alimentación de los animales.....	11
▪ Manejo de conejos.....	11
3.1.2.2 Realización de pruebas.....	12
▪ Prueba de pirógenos.....	12
▪ Prueba de inocuidad para bacterinas.....	13
▪ Prueba de absorción de hierro.....	13
▪ Prueba de seguridad general.....	14
▪ Prueba de potencia para bacterinas.....	14
▪ Prueba de potencia por desafío de toxoide tetánico.....	15
▪ Valoración biológica de hormonas.....	16
3.1.3 Sacrificio de animales.....	17
3.1.4 Manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos.....	17
3.2 Laboratorio de Investigación y Asistencia Técnica “F. Ernesto Favela Álvarez”.....	18
3.2.1 Pruebas realizadas.....	18
▪ Prueba de irritabilidad ocular.....	18
▪ Prueba de irritabilidad en piel.....	19
▪ Prueba de inyección sistémica.....	20
▪ Prueba intracutánea.....	21
▪ Otras pruebas.....	22
3.3. Laboratorio de Control de Calidad fisicoquímico y biológico y Bioterio del Departamento de Control de Calidad de Intervet México.....	22
3.3.1 Área de laboratorio químico y microbiológico.....	23
3.3.2 Bioterio.....	24

3.3.2.1 Actividades realizadas.....	24
▪ Manejo de embriones.....	24
▪ Crianza y mantenimiento de las aves.....	25
▪ Obtención de muestras sanguíneas.....	25
▪ Prueba de inocuidad para vacunas aviares a virus vivo.....	26
▪ Prueba de inocuidad para vacunas monovalentes o polivalentes a virus inactivo.....	26
3.3.3 Área de aisladores.....	26
3.3.3.1 Actividades realizadas.....	27
▪ Alimentación de los animales.....	27
4. Conclusiones.....	27

II. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE SEGURIDAD GENERAL

1. Sinonimia.....	29
2. Objetivos.....	29
3. Fundamento.....	29
4. Desarrollo de la técnica.....	30
▪ Sujeto de experimentación.....	30
▪ Material.....	31
▪ Vía de administración.....	31
▪ Requisitos para la aprobación del producto.....	32
▪ Eutanasia de los animales.....	32
▪ Manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos.....	33
5. Biología y condiciones del mantenimiento de los ratones de prueba.....	34
6. Reglamentación.....	36
7. Requisitos de la prueba y del formato de reporte de resultados de la prueba según la NMX-EC-17025-IMNC-2006.....	38
8. Técnicas alternativas de la prueba de seguridad general.....	40
▪ Procedimiento de dosis fija.....	41
▪ Método de clasificación de toxicidad.....	42
▪ Proceso “arriba-abajo”.....	42
8.1 Otras alternativas.....	43
9. Principios generales de Buenas Prácticas de Laboratorio.....	45
▪ Organización.....	45
▪ Personal.....	46
▪ Instalaciones.....	46
▪ Áreas.....	46
▪ Equipos e instrumentos.....	47
▪ Reactivos.....	47
▪ Muestras.....	47
▪ Ensayos y análisis.....	48
▪ Procedimientos normalizados de operación.....	48
▪ Programas de seguridad.....	49
▪ Auditorías.....	50
10. Bibliografía y fuentes de consulta.....	51

INFORME FINAL DEL TRABAJO PROFESIONAL

I. REPORTE DE ACTIVIDADES

1. INTRODUCCIÓN

El titular de una empresa productora de medicamentos debe asegurar que los mismos son adecuados para su uso previsto, mediante el cumplimiento de requisitos de autorización para la comercialización; tanto para productos nuevos como para los que actualmente están en venta. Existen normas de correcta fabricación de medicamentos que se refieren a la producción y al control de calidad, dicho control incluye el muestreo, especificaciones y ensayos, así como los procedimientos de organización, documentación y aprobación, que garantizan la ejecución real de las pruebas pertinentes y que los productos no queden aprobados para su uso ni para su distribución y venta, hasta que su calidad haya sido considerada satisfactoria.

Para cumplir con estas condiciones, debe haber métodos de ensayo analíticos validados¹, entre los cuales se encuentran los análisis de constatación, que consisten en la verificación del cumplimiento de los requisitos descritos en normas oficiales, leyes o reglamentos vigentes.²

En México, el artículo 195 de la Ley General de Salud, establece que la Secretaría de Salud es la encargada de emitir las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) a que debe sujetarse el proceso y especificaciones de los productos químicos y biológicos de uso humano (medicamentos y demás insumos para la salud) y que estarán normados por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).³

Para productos de uso veterinario se siguen los lineamientos descritos en las Normas Oficiales Mexicanas emitidas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).⁴

Dichas especificaciones permiten mantener estrictos niveles de seguridad y calidad de los productos, equivalentes a los requeridos en otros países.

En el área de constatación, existen pruebas reglamentarias que requieren el uso de animales para evaluar la seguridad, eficacia o posibles efectos perjudiciales para la salud⁵, tanto de los trabajadores durante su fabricación, así como para los consumidores y el medio ambiente⁶, de los productos

químicos y los nuevos productos como vacunas, medicamentos, aditivos alimentarios, plaguicidas y productos químicos industriales.⁵

A los procedimientos que estiman la naturaleza, constitución o potencial de un material o de un proceso de control de calidad por medio de la reacción que sigue a su aplicación en la materia viva, se les conoce como ensayos biológicos o bioensayos¹; en los cuales se emplean animales de laboratorio como rata, ratón, cuyo, conejo entre otros; dependiendo de los requisitos y especificaciones individuales de cada prueba (determinación de pirógenos, toxicidad aguda, pruebas de potencia para biológicos, etc.).

Es aquí donde el Médico Veterinario Zootecnista juega un papel muy importante, ya que es la persona indicada para la realización de este tipo de análisis pues cuenta con los conocimientos necesarios para el manejo y contención de animales, así como también con la responsabilidad y ética profesional para trabajar bajo un estricto marco de respeto hacia dichos animales de experimentación.

2. OBJETIVO

Adquirir los conocimientos referentes a la realización de pruebas de constatación de productos químicos y biológicos, producción y manejo adecuado de animales de experimentación, así como analizar el marco regulatorio vigente.

3. ACTIVIDADES REALIZADAS

Durante el Trabajo Profesional se realizó una rotación dentro de tres laboratorios que llevan a cabo pruebas de control de calidad de productos químicos y biológicos:

- Unidad de Constatación de Productos Químico-Biológicos y Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Laboratorio de Investigación y Asistencia Técnica “F. Ernesto Favela Álvarez” de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.
- Laboratorio de Control de Calidad Físicoquímico y Biológico y Bioterio del Departamento de Control de Calidad de Intervet México, S.A de C.V. Sitio Santiago Tianguistenco, Estado de México.

3.1 UNIDAD DE CONSTATACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICO-BIOLÓGICOS Y BIOTERIO (UCPQBYB) DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTEENIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

La UCPQByB es un laboratorio de Control Analítico Auxiliar a la Regulación Sanitaria autorizado por la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) de la Secretaría de Salud, que ofrece el servicio de constatación de productos químicos y biológicos a diversas empresas farmacéuticas; tanto de productos para uso humano como veterinario.

Actualmente cuenta con un sistema de gestión de calidad, que se encuentra en mejora continua y que con base en los lineamientos que establece la NMX-CC-9001-IMNC-2000, ha certificado el proceso de constatación de dichos productos, satisfaciendo las necesidades del usuario en el marco regulatorio establecido.

El laboratorio se encuentra dividido en tres áreas:

- Área de pruebas
- Área de producción
- Área de coordinación

Durante el Trabajo Profesional se realizaron distintas actividades en las primeras dos áreas:

3.1.1 AREA DE PRODUCCIÓN

El bioterio es el área especializada en la reproducción, mantenimiento y control de diversas especies de animales de laboratorio durante una o varias fases de su ciclo vital; esto es: nacimiento, desarrollo, reproducción y muerte. Manteniéndolos en óptimas condiciones para su utilización en la experimentación, investigación científica y desarrollo tecnológico.^{7,8} Un animal de laboratorio es aquel elegido de manera deliberada por su inherente aplicación para un propósito de estudio, especialmente criado en cautiverio y posiblemente con alguna modificación (fisiológica o genética), procurando su entorno, haciéndolo conveniente para el contexto de la investigación. Son utilizados en el desarrollo tecnológico y científico, innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza.⁷

Dentro de la UCPQByB, se lleva a cabo la producción de ratones y cuyos de tipo convencional⁷, los cuales se utilizan en la realización de pruebas de constatación de diversos productos químicos y biológicos.

El área de producción se encuentra dividida en área de reproducción de ratones y área de reproducción de cuyos.

Por las condiciones de seguridad que se deben mantener en el laboratorio es necesario el uso de ropa de trabajo adecuada así como medidas de bioseguridad, tales como la utilización de cubre bocas y guantes.⁹

3.1.1.1 ACTIVIDADES REALIZADAS

- **Condiciones ambientales:**

Debido a que se tienen condiciones ambientales controladas estrictamente para el mantenimiento adecuado de los animales, se registraron diversos parámetros relacionados con el ambiente conservándolos dentro de un rango óptimo. Diariamente se monitoreó la temperatura y humedad relativa.

Los cuartos de alojamiento para animales de laboratorio deben permanecer a una temperatura estable entre 18 y 22 °C.⁷ y una humedad relativa de 40-70%.

Las lecturas de temperatura y humedad relativa se determinan mediante un psicrómetro que consta de dos bulbos, uno seco y otro húmedo; la determinación de la temperatura se realiza con la lectura del bulbo seco. Con la lectura del bulbo húmedo se determina la humedad relativa, midiendo la diferencia de grados entre los bulbos y con el resultado, se calcula el

porcentaje utilizando las tablas de humedad relativa.⁹ Dichos parámetros ambientales fueron monitoreados diariamente a las 7, 12 y 17 horas.

Se realizó el encendido de luces diariamente del área de trabajo; la iluminación es de tipo artificial proporcionada por lámparas fluorescentes, el ciclo de fotoperiodo es de 12 por 12 horas.⁷

Se contribuyó a mantener las áreas de trabajo en silencio ya que los animales no deben sobrepasar una intensidad de ruido de 85 dB.⁹

Se vigiló el correcto funcionamiento del sistema de ventilación, que cuenta con un rango de 15 a 18 recambios de aire por hora ininterrumpidamente durante las 24 horas del día, con el fin de favorecer el ambiente para los animales.^{7,9}

▪ **Alimentación de los animales:**

Diariamente se les proporcionó alimento y agua a cuyos y ratones, procurando el llenado continuo de los comederos y bebederos, ya que éstos requieren una alimentación a libre acceso. El alimento ofrecido es palatable, de forma nutricional constante, libre de aditivos, drogas, antibióticos, hormonas, pesticidas y contaminantes, almacenado en una bodega seca, ventilada y colocado sobre tarimas.⁷ La composición bromatológica del alimento ofrecido debe contener los siguientes requerimientos:

ANIMAL	PROTEINA CRUDA %	GRASA CRUDA %	FIBRA CRUDA %	CENIZAS %	CONSUMO DIARIO DE ALIMENTO	CONSUMO DIARIO DE AGUA	VITAMINA C
cuyo	17-25	4-11	12-16	7-9	25-30 g	12-15 ml/100g	0.25-1 mg/g
ratón	17-24	4-11	3-5	5-7	3-6 g	3-7 ml	-

Tabla 1. Requerimientos nutricionales para ratones y cuyos.⁷

En la UCPQByB se ofrece alimento comercial Ziegler[®] autoclaveable para roedor NIH-31:18-4 y para cuyo NIH-34M que garantiza el cumplimiento de los parámetros mencionados para cada especie.

Los cuyos adultos consumen aproximadamente 5 g de alimento y de 10 a 40 ml de agua por cada 100 g de peso; el cuyo requiere de la administración de un suplemento de ácido ascórbico debido a que es deficiente en vitamina C. Si los alimentos que se le están suministrando no los contienen, deben añadirse 200

mg/lit de vitamina C en el agua de bebida, teniendo en cuenta que la actividad de dicha vitamina en los bebederos abiertos disminuye en casi un 50% en un plazo de 24 horas.^{10,11}

Un ratón adulto consume aproximadamente 3 g de alimento por cada 25 g de peso corporal diariamente, el consumo puede verse afectado de acuerdo a la temperatura y humedad relativa del ambiente, sequedad y calidad del alimento, así como el estado reproductivo y físico.¹⁰

- **Limpieza y desinfección:**

En los bebederos del área de ratones se utilizó agua corriente y jabón, desinfectando los tapones con solución de cloro al 2%; esta actividad se realiza un día a la semana, los bebederos del área de cuyos se lavaron una vez al mes de la misma forma.⁹

Se realizó el cambio de cajas y cama del área de cuyos los días lunes y jueves, se reciben las cajas limpias con el material de cama, se toma la caja sucia del anaquel, se pasan los animales uno a uno tomándolos con una mano alrededor del abdomen, se pone la reja en la caja limpia y ésta se coloca en el anaquel.⁹

El cambio de cajas y cama del área de ratones se realizó los días lunes, miércoles y viernes, dichas cajas se reciben limpias del área de lavado, se toma una por una, se coloca el material de cama correspondiente y posteriormente se cambian los animales uno por uno; tomándolos de la cola, se coloca la reja y al terminar este paso se coloca la caja limpia en el anaquel, en ambos casos las cajas sucias se pasan al área de lavado.⁹

El material de cama utilizado debe garantizar la absorción de la orina, excremento, desperdicio de agua, y favorecer la anidación, contener pocas partículas de polvo y no debe ser palatable.⁷

Al término de todas las actividades diarias, se realizó la limpieza general de las distintas áreas para mantener el orden y las condiciones de higiene.⁹

- **Manejo general de los animales:**

Se llevó a cabo la identificación de las unidades de producción del área de cuyos y ratones, colocando tarjetas individuales en cada caja, señalando el número de unidad de producción, cada unidad corresponde a un macho.

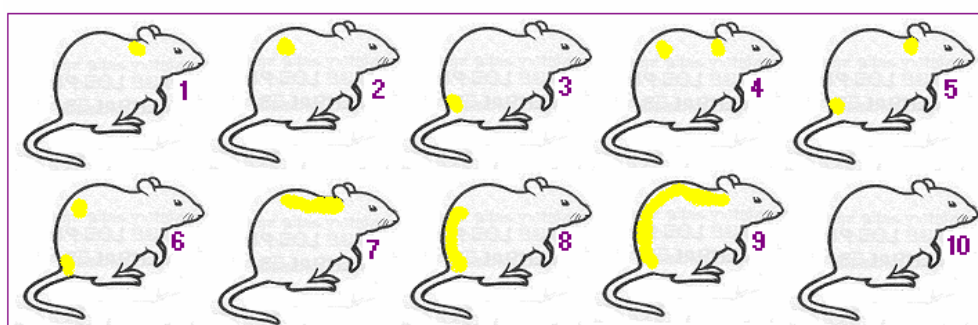
Las hembras en estado gestante o lactando se identifican con una tarjeta individual con los siguientes datos: número de lote, fecha de formación de lote, fecha de parto, número de animales nacidos y número de macho con el cual se aparearon.⁹

Se llevó a cabo la identificación de los animales que fueron solicitados por el área de pruebas y ratones hembras gestantes.

El marcaje de los animales puede ser de forma permanente o temporal, el modo permanente es por medio del muesqueo de las orejas utilizando un aretador para realizar una perforación, los ratones hembras gestantes fueron marcadas de ésta manera, sujetándolas por la punta de la cola con el dedo índice y pulgar, dirigiendo dicha extremidad hacia el frente de tal modo que los dedos que detienen a la cola queden a la altura del cuello, de esta manera se inmoviliza el animal y se realiza la perforación con la mano contraria, utilizando el aretador.⁹

El marcaje de forma temporal se realiza utilizando colorantes (ácido pícrico al 1%) sobre el pelo de los animales, en este caso se sujeta al ratón con el dedo pulgar e índice de la punta de la cola, se coloca sobre una reja para que el animal se pueda detener y así poder aplicar el ácido pícrico utilizando un aplicador.⁹

A continuación se presenta un esquema del tipo de marcaje que se utiliza en la UCPQByB:



Esquema 1.Marcaje temporal en ratones utilizado en la UCPQByB⁹

▪ **Reproducción de ratones:**

Se llevaron a cabo todas las actividades relacionadas con la reproducción de ratones.

El área de ratones cuenta con 18 unidades de producción formadas por un macho de la cepa ICR (CD1) en edad reproductiva (mayores de 27 g). El modelo de reproducción utilizado en esta área es el llamado “Modelo 5”, que consiste en mantener a la hembra y el macho juntos por cinco días, que es el tiempo que dura el ciclo estral de la hembra. Los núcleos de apareamiento son formados todos los días miércoles, transcurrido éste periodo las hembras son colocadas en cajas individuales hasta la fecha del parto, son alojadas durante la gestación (19 a 21 días) y lactancia (4 a 6 semanas).⁹ Las crías son destetadas al alcanzar 15 g de peso, separadas por sexo y colocadas en cajas hasta que sean solicitadas por el área de pruebas.

El espacio mínimo que deben tener los ratones se presenta en la siguiente tabla:

PESO EN GRAMOS	AREA DEL PISO POR ANIMAL EN cm ²	ALTURA EN cm DEL PISO AL TECHO DE LA JAULA O CAJA
<10	39	12
10-15	52	12
15-25	78	12
>25	97	12

Tabla 2. Espacio mínimo vital de ratones en jaulas o cajas, de acuerdo a su peso.⁷

El sexado de ratones se realiza reconociendo al macho mediante una o más de las siguientes características: mayor distancia ano-genital con respecto a la hembra (1.5-2 veces mayor), presencia de bolsa escrotal y mayor tamaño de la papila genital.¹⁰

Las hembras no gestantes son marcadas y colocadas juntas en una caja, posteriormente cuando repiten esta condición por 3 veces son sacrificadas.^{7,9}

Las hembras gestantes son marcadas en la oreja izquierda con una muesca y son retiradas de producción al acumular 5 gestaciones al cabo de las cuales serán sustituidas por hembras de reemplazo.⁹

Los animales para reemplazo son comprados en un centro de producción especializado que certifica que se encuentran clínicamente sanos y libres de enfermedades (Rismart®). También pueden ser seleccionados de la misma

colonia. Al ingresar a la unidad de producción pasan por un periodo de cuarentena de 15 días, adaptación y acondicionamiento. Los machos son reemplazados a criterio del MVZ o cada 8 meses.⁹

▪ **Reproducción de cuyos:**

Se realizaron todas las actividades referentes a la reproducción de los cuyos.

El área de producción de cuyos está formada por 30 unidades de producción constituidas por un macho y una o dos hembras en edad reproductiva (mayores de 500 g). La raza de los cuyos utilizada es Dunkin-Harley, albinos. El modelo de reproducción llevado a efecto, es el de núcleo permanente (el macho y la hembra siempre están juntos).

El tiempo de gestación es de 70 a 74 días y el periodo de lactancia puede durar de 4 a 5 semanas. Las hembras que durante 7 meses no queden gestantes son reemplazadas, al igual que las que acumulan 10 partos. Los machos son reemplazados cada 3 años o según el criterio del MVZ.⁹

Las crías se destetan al alcanzar los 200 g de peso y se separan por sexo, el sexado de cuyos se realiza reconociendo a la hembra por la presencia de la abertura genital en forma de “U” (membrana vaginal) entre el orificio uretral y el ano, el macho carece de abertura genital. Para poner de manifiesto dicha membrana, debe colocarse el índice y el pulgar de cada mano a ambos lados de la protuberancia uro-genital, al separar suavemente los dedos y ejercer cierta presión, se revela la membrana. En los machos, se palpan fácilmente los testículos y el pene; que puede exteriorizarse mediante una ligera presión digital.^{10,11} Una vez sexados se alojan en cajas hasta que son solicitados por el área de pruebas.⁹

El espacio necesario para cuyos se presenta en la siguiente tabla:

PESO EN GRAMOS	AREA DEL PISO POR ANIMAL EN cm ²	ALTURA EN cm DEL PISO AL TECHO DE LA JAULA O CAJA
<350	387	18
>350	652	18

Tabla 3. Espacio mínimo vital de cuyos en jaulas o cajas, de acuerdo a su peso.⁷

3.1.2 ÁREA DE PRUEBAS

En esta área se llevan a cabo las pruebas de constatación de las distintas muestras que envían las empresas farmacéuticas.¹² Está dividida en: área de alojamiento para ratones y cuyos bajo pruebas, área para la preparación de muestras y área para la realización de la prueba de pirógenos (para la realización de dicha prueba es necesaria la utilización de conejos adquiridos con un proveedor externo).

Para el ingreso, es imprescindible el uso de bata, guantes y cubre bocas, el uso de goggles se realiza sólo cuando es necesario.¹²

Una vez recibida y registrada la muestra en el área de coordinación, ésta es analizada mediante la técnica enviada por el laboratorio, si éste no especifica la técnica, se realiza la prueba mediante el método establecido en la FEUM. Todas las pruebas que se realizan en la UCPQByB requieren el uso de animales.

3.1.2.1 ACTIVIDADES REALIZADAS

- **Realización general de pruebas:**

De acuerdo con la prueba solicitada y los requisitos necesarios para llevar a cabo la técnica:

Se solicitaron los animales al área de producción, marcados y pesados, se prepararon las muestras químico- biológicas para su análisis, se inocularon a los animales necesarios por las vías de administración indicadas, se colocaron a los animales en el área correspondiente al término de la inoculación del producto, indicando en una tarjeta el nombre de la prueba, nombre del producto, número de control interno, fecha de inicio y término de la prueba, se llenaron las hojas de campo correspondientes para la realización de las lecturas indicadas.⁸ Se realizó la lectura de las pruebas de acuerdo a los parámetros marcados en la técnica, anotando las observaciones necesarias en los formatos correspondientes.

Al finalizar la prueba se entregaron los registros de campo a la coordinación de la UCPQByB.

- **Condiciones ambientales:**

Se realizaron las mismas actividades mencionadas en la producción de animales, debido a que las condiciones en las cuales deben permanecer los animales de prueba deben ser las mismas que las de los animales en producción para evitar la alteración de los resultados de las pruebas.

- **Limpieza y desinfección:**

Se realizaron las mismas actividades mencionadas en producción de animales, con la diferencia de que el cambio de cama se hace los días lunes y jueves.

Se ejecutó la limpieza del material con el cual se preparan las muestras químico biológicas para su análisis. Se dejan en una solución de cloro al 2% por 24 horas para su desinfección y se lavan con detergente Extrán® y agua corriente, enjuagándolos con agua destilada, una vez limpio y seco, el material se tapa con papel aluminio y se despirogeniza en un horno de calor seco a 250° C por 30 minutos.¹²

- **Alimentación de los animales:**

Se realizaron las mismas actividades mencionadas en producción de animales para ratones y cuyos, se alimentó a los conejos una vez al día proporcionándoles 150 g de alimento; consumo normal de un conejo adulto.

Los conejos se mantienen bajo una dieta restringida, ya que para la realización de la prueba de pirógenos es necesario que se encuentren con 18 horas de ayuno.

La alimentación de los conejos debe cubrir los requerimientos mínimos nutricionales para su mantenimiento, 16% de proteína cruda, 2.5% de grasa cruda, 14% de fibra cruda y 8.0% de cenizas.^{7,10,11} El alimento proporcionado en la UCPQByB cumple con los parámetros mencionados.

Diariamente se les proporcionó agua, vigilando que los bebederos permanecieran llenos, cabe señalar que todos los animales bajo prueba fueron alimentados a libre acceso, con excepción de los conejos.

- **Manejo de conejos:**

Para la realización de la prueba de pirógenos es necesaria la utilización de conejos machos debido a que su temperatura corporal se mantiene en un

rango aceptable (38.5-39.5 °C)¹⁰ y no aumenta, como en el caso de las hembras, en presencia del ciclo estral. La UCPQByB no cuenta con el espacio suficiente para reproducir ésta especie, además de que no es redituable su reproducción ya que sólo se necesitan machos para llevar a cabo la prueba, por tal motivo los conejos son adquiridos de bioterios externos.

Se realizó la revisión general del estado de salud de éstos anotando su peso, posteriormente se alojaron en jaulas de 0.28 m² individualmente y se mantuvieron en un periodo de cuarentena de 2 semanas. Terminado éste tiempo se les asignó un número, el cual es tatuado; para tatuar a los conejos se les anestesia localmente el interior de la oreja izquierda con xilocaína al 10%, se moja la tiza del tatuado con tinta y se pinta el área rociada con el anestésico, con una tatuadora manual se colocan los números ejerciendo presión y evitando lesionar las venas y arterias centrales de la oreja.¹²

3.1.2.2 REALIZACIÓN DE PRUEBAS

- **Prueba de pirógenos:**

La prueba consiste en el registro de la temperatura de conejos como respuesta a la presencia de agentes pirogénicos principalmente endotoxinas bacterianas. Se utilizaron 3 conejos albinos con un peso de 1.5 kg a 3 kg., los cuales fueron colocados en cepos individuales para inmovilizarlos parcialmente, se les insertó un sensor de temperatura en el recto a una profundidad no menor de 7.5 cm.

Una hora más tarde, se registró la primera temperatura corporal, la segunda lectura se hizo media hora después para determinar la temperatura control. El conejo que mostrara una variación mayor de 0.2 °C entre dos temperaturas sucesivas, no podía ser utilizado en la prueba, se inoculó la muestra a una dosis no mayor de 10 ml/kg ni menor de 0.5 ml/kg por vía intravenosa en un periodo no mayor de 10 minutos ni menor de 2.

El área para la realización de esta prueba necesita estar a una temperatura de 20 a 23 °C, sin ruido u otros factores que exciten a los conejos, las muestras se prepararon cerca de la flama del mechero y una vez listas se colocaron en baño María a 38-39 °C para asemejar la temperatura corporal del conejo al momento de ser inoculadas. Después de la inoculación del producto se realizaron 3 lecturas más de temperatura, con un periodo de diferencia entre ellas de 1 hora.

Si ningún conejo mostraba un incremento individual de 0.5 °C o más con respecto a su temperatura control, la muestra cumplía los requisitos para ausencia de pirógenos.

Después de haber terminado la prueba los conejos se sacaron de los cepos y fueron llevados a sus jaulas, las terminales de los termómetros se limpiaron con agua y desinfectaron con alcohol.¹³

- **Prueba de inocuidad para bacterinas:**

Tiene como finalidad comprobar la ausencia de toxicidad anormal en un producto perteneciente a un lote terminado de alguna bacterina. Se busca encontrar reacciones desfavorables que pueda causar el producto no atribuible a la composición del mismo.

Consistió en inyectar 2 ml del producto, vía subcutánea, a 2 cuyos con un peso aproximado de 250 a 350 g de peso, los animales se revisaron diario por un periodo de 7 días, anotando las observaciones necesarias.

El producto se considera inocuo si durante la prueba los animales sobrevivieron, no presentaron signos significativos de toxicidad, ni pérdida de peso.¹³

- **Prueba de absorción de hierro:**

Esta prueba tiene como objetivo verificar que el hierro administrado por vía intramuscular no forme depósitos de hierro no absorbido, se utilizaron 2 conejos albinos de 1.5 a 2.5 kg de peso, se les inyectó el producto a una dosis de 0.4 ml/kg por vía intramuscular procurando que fuera en el músculo semitendinoso de una de las piernas de cada uno de los conejos.

Después se alojaron los animales en sus jaulas y 7 días posteriores a la inoculación de hierro se sacrificaron⁹ para disecar ambas piernas y examinar los músculos (semitendinoso, semimebranoso y gracilis), verificando que el tejido muscular de la pierna inyectada, estuviera coloreado ligeramente con un tono rojizo-anaranjado y que no se formaran depósitos de color café oscuro de los compuestos de hierro no absorbidos, ni evidencia de escurrimiento de los planos faciales. La disección de la otra pierna sirvió como referencia.¹³

- **Prueba de seguridad general:**

La prueba de seguridad general permite detectar cualquier toxigenicidad inesperada e inaceptable que pudiera haberse introducido durante su manufactura o almacenamiento del producto, esta toxigenicidad se distingue de la toxicidad intrínseca del producto.

Se utilizaron 5 ratones albinos marcados con un peso de 18 a 22 g, cada producto se reconstituyó con su diluyente o con algún otro según la técnica, la dosis de prueba (concentración y volumen) y la vía de administración se realizaron según la monografía individual, se realizó la inoculación del producto por vía sistémica (intravenosa, intraperitoneal, subcutánea u oral), se observó a los animales durante 48 horas, anotando su estado de salud a las 24 y 48 horas.

Si al final del periodo de observación sobrevivían los animales mencionados según las especificaciones de cada producto, la prueba de seguridad era considerada satisfactoria.¹³

- **Prueba de potencia para bacterinas:**

Tiene como objetivo demostrar la capacidad que tienen las bacterinas que contengan la fracción de cierta bacteria (*Clostridium chauvoei*, *Manhemia haemolytica*, *Pasteurella multocida*), en inducir una respuesta inmune que sea potente para proteger contra un desafío con cepas patógenas de dicha bacteria.

Para la fracción de *Clostridium chauvoei* se utilizaron 13 cuyos; 8 para formar el grupo de prueba y 5 para el grupo control, el grupo de prueba se inoculó por vía subcutánea con 1ml del producto a probar, 14 días después se reinocularon por la vía y dosis mencionadas; en este lapso los animales fueron observados diariamente, anotando el estado clínico de los animales en los registros correspondientes. 21 días después de la última inoculación el grupo de prueba y el grupo control, fueron desafiados por medio de la administración de 1 ml vía intramuscular de una suspensión 100 dosis letales 50%/ml (100DL_{50%}) de una cepa patógena de *Clostridium chauvoei*.

Los animales fueron observados diariamente por un periodo de 3 días post desafío, anotando el estado clínico o la mortalidad en el registro correspondiente, para que la prueba se considerara satisfactoria, un mínimo de

7 animales inmunizados debía sobrevivir y mínimo 4 de los animales control, debían morir durante el periodo post desafío.

Para la fracción de *M. haemolytica* y *P. multocida*, se utilizaron 80 ratones con un peso de 18 a 25 g, divididos en 2 grupos de 40 para formar el grupo control y el de prueba.

Se inoculó el grupo de prueba con 0.5 ml del producto por vía intraperitoneal, 10 días después los animales fueron reinoculados por la vía y dosis antes mencionada, se observó a los animales durante el periodo de post inoculación anotando su estado clínico en el registro correspondiente.

Terminado este periodo se desafiaron ambos grupos de animales con diluciones de 10^{-4} a 10^{-7} de una solución con *M. haemolytica* o *P. multocida* según el caso. Los animales desafiados fueron observados por un período de 5 días anotando su estado clínico o mortalidad en el formato correspondiente, se calculó la dosis letal en ratón 50% (DL_{50%}) para cada uno de los grupos.

El valor logarítmico obtenido en el grupo de prueba se le resta el valor obtenido en el grupo control con lo que se obtiene el índice de protección en ratón, para que la prueba fuera satisfactoria debía existir un índice de protección en ratón con una diferencia mínima de 2 logaritmos entre el grupo control y el grupo inmunizado.¹³

▪ **Prueba de potencia por desafío de toxoide tetánico:**

La prueba se realiza para demostrar que 0.25 ml (1/6 de la dosis humana) del toxoide tetánico por vía subcutánea, es capaz de producir una respuesta inmune contra un desafío con toxina tetánica ajustada a 10 dosis letales 50% por 0.25 ml (10DL_{50%}/0.25 ml). Se utilizaron 15 cuyos de 250 a 350 g de peso; 10 animales formaron el grupo de prueba y los 5 restantes el grupo control.

Se inoculó a éste último con la vía y dosis antes mencionada, observando a los animales en un periodo post inoculación de 30 días y anotando su estado clínico en el registro correspondiente. Terminado dicho periodo se desafiaron ambos grupos por la vía y dosis antes dicha observando a los animales por 10 días más; para que la prueba se considerara satisfactoria, debían sobrevivir cuando menos el 8 animales del grupo de prueba sin presentar signos de tétanos y mínimo 4 de los cuyos del grupo control debían presentar signos y morir de tétanos durante el periodo post desafío.¹³

▪ **Valoración biológica de hormonas:**

Tiene como objetivo determinar que cierta cantidad de unidades internacionales (UI) de una hormona administradas en un animal, estén dentro del rango establecido en la FEUM, no menor del 80% ni mayor al 125% de lo indicado en el marbete.

Para la Gonadotropina Coriónica Humana (HCG), se utilizaron 60 ratas macho, de 21 a 28 días con un peso entre 40 y 50 g; 30 animales subdivididos en 3 grupos de 10 formaron el grupo control, los animales restantes divididos de la misma forma dieron lugar al grupo de prueba.

Para el grupo control se realizó el siguiente procedimiento: primero se preparó una solución reguladora de albúmina con un pH cercano al neutro (7.1-7.2), después se preparó una solución de HCG a base del buffer, para dar lugar a la solución estándar primaria, con ésta última solución se realizaron varias diluciones para formar la solución estándar de dosis alta, dosis media y dosis baja.

Para el grupo de prueba, se utilizó el producto y con él se preparó una solución muestra primaria, para dar lugar a la solución muestra de dosis alta, media y baja.

Una vez preparadas las soluciones estándar y muestra, éstas se administraron a las ratas en una dosis de 0.2 ml por vía subcutánea.

El primer día se inocularon en la tarde, del segundo al sexto día sólo en la mañana y al octavo día se sacrificaron, retirando las vesículas seminales, pesándolas para posteriormente realizar un cálculo estadístico y comprobar que la cantidad de HCG que se administró corresponde proporcionalmente al aumento del volumen de las glándulas seminales, debido a que la HCG forma sustancias androgénicas, las cuales causan un crecimiento en las vesículas seminales.¹³

También se realizó una valoración biológica de la Hormona Folículo Estimulante (FSH), se realizó el mismo protocolo con la diferencia de que las ratas utilizadas son hembras, además la muestra o el producto está hecho a base de FSH y de que la inoculación se hizo de la siguiente manera: el primer día se inocularon al medio día, el segundo día se inocularon tres veces (por la mañana, a medio día y en la tarde) y el tercer día se inocularon sólo por la mañana y por la tarde, el cuarto día no se inocularon y para el quinto día las

ratas habían sido sacrificadas, removiendo los ovarios y procurando eliminar el tejido adiposo, posteriormente se pesaron los ovarios de cada rata, después de éste procedimiento se realiza un cálculo estadístico para comprobar que la cantidad de FSH que se administró, corresponde en proporción al aumento del volumen de los ovarios, sabiendo que la FSH estimula el desarrollo folicular de éstos.^{13,14} Cabe señalar que el resultado del peso de los órganos se envió al laboratorio para que ellos llevaran a cabo los cálculos estadísticos y determinaran si corresponden a los parámetros establecidos según la FEUM.

3.1.3 SACRIFICIO DE ANIMALES

Se realizó el sacrificio de todos los animales que a criterio del MVZ lo requirieron.⁹

Los ratones son sacrificados por dislocación cervical y los suyos mediante la administración de 90 mg/kg de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal.⁷

Al término de las pruebas donde fueron utilizados suyos y ratones, se sacrificaron bajo los parámetros indicados anteriormente.

Los conejos que sobrepasan los 3 kg de peso son sacrificados con 210 mg/kg de pentobarbital sódico por vía intravenosa.⁷

3.1.4 MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS

Los residuos peligrosos biológico infecciosos son aquellos materiales generados durante los servicios de atención médica, que contienen agentes biológico infecciosos ya sean partes anatómicas, fracciones de tejidos u órganos, excreciones o secreciones obtenidas de un animal vivo o muerto para su análisis que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.⁸

La cama de los animales bajo pruebas donde fueron utilizados agentes patógenos se dispone en bolsas rojas, al igual que el material de curación como gasas y torundas. Todos los materiales punzo cortantes que estuvieron en contacto con muestras biológicas, son envasados en recipientes rígidos de polipropileno de color rojo.

El material de vidrio es desinfectado y esterilizado para ser dispuesto como residuo municipal.

Los animales muertos o sacrificados se disponen en bolsas de color amarillo, identificándolas como residuos patológicos.

Todos los residuos generados pueden ser almacenados temporalmente si no son dispuestos inmediatamente, hasta por un periodo de 15 días; que es el tiempo permitido para la UCPQByB como generador de residuos de nivel II, según la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Los cadáveres tendrán que mantenerse bajo refrigeración a 4 °C. Después de éste lapso, con excepción del material de vidrio, se disponen a ser incinerados.⁸

3.2 LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA TÉCNICA “F. ERNESTO FAVELA ÁLVAREZ” DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

Es un laboratorio de Control Analítico Auxiliar en la Regulación Sanitaria, que se dedica al análisis de distintos productos entre ellos a la constatación de productos químicos y biológicos de uso humano y veterinario.

Está formado por tres áreas:

- Área de Químicos
- Área de Microbiológicos
- Área de Biológicos

Durante la estancia en éste laboratorio se realizaron diferentes pruebas de constatación de productos químicos de uso humano, en el área de biológicos. Las cuales se describen a continuación:

3.2.1 PRUEBAS REALIZADAS

- **Prueba de irritabilidad ocular:**

La prueba tiene como objetivo determinar las alteraciones fisiológicas de las membranas oculares de conejos sanos que se pueden presentar después de la aplicación de un producto. Se utilizaron 3 conejos albinos que no presentaran defectos o irritación ocular visible, fueron colocados en cepos para facilitar el manejo, se probó una muestra líquida, la cual fue instilada en una cantidad de 0.1 ml a la conjuntiva del ojo derecho de los conejos, utilizando el ojo izquierdo como referencia.

Para la aplicación de la muestra se separó cuidadosamente el párpado inferior hacia fuera del globo ocular a manera de formar un recipiente en donde se

instiló la muestra, manteniendo el párpado cerrado por un segundo, una vez administrado el producto, los animales fueron examinados a las 24, 48 y 72 horas, registrando el grado de irritación ocular mediante el uso de una lupa y una lámpara de Wood. Se aplicó una gota de fluoresceína sódica estéril al 2% en la córnea, eliminando el exceso con cloruro de sodio estéril al 0.9%.^{13,15}

En un cuarto oscuro se encendió la lámpara que emite luz ultravioleta, haciendo visibles las áreas dañadas de color amarillo, para evaluar los resultados de la prueba se observaron las lesiones ocurridas en la conjuntiva, córnea e iris, de acuerdo con los parámetros mencionados en la NOM-039-SSA1-1993. Bienes y servicios. Productos de perfumería y belleza. Determinación de los índices de irritación ocular, primaria dérmica y sensibilización. Para clasificar al producto como no irritante, ligeramente irritante, irritante, o severamente irritante.¹⁵

- **Prueba de irritabilidad en piel:**

Esta prueba pone en manifiesto las reacciones inflamatorias locales que se presentan sobre la piel intacta y piel erosionada de conejos albinos previamente rasurados, después de la aplicación de una sustancia.

Se utilizaron 6 conejos adultos con un peso aproximado de 2 a 3.5 kg, un día antes de la prueba se les rasuró el área dorsal de cada animal de ambos lados de la columna vertebral de la región escapular a la lumbar, evitando generar irritación mecánica.

El día de la prueba se delimitaron cuatro áreas de 4 cm por lado; en dos de ellas, intercaladas, se hizo una incisión cuidando de no lesionar la dermis o causar sangrado con un rastrillo. Se aplicaron en las cuatro áreas 0.5 g del producto, y se cubrió cada una de éstas con un parche de gasa cuadrado de 2.5 cm de lado y un grosor de dos monocapas.

Los parches se aseguraron con tela adhesiva para evitar fugas del producto, el tronco de cada animal se cubrió con material impermeable para mantener los parches en su lugar y retardar la evaporación. Después de 24 horas los parches se retiraron y se evaluaron las reacciones resultantes, observando la formación de eritema, escaras y edema. A las 72 horas se vuelven a observar dichas lesiones si fueron formadas, registrando un valor para cada una de ellas según la NOM-039-SSA1-1993 Bienes y servicios. Productos de perfumería y

belleza. Determinación de los índices de irritación ocular, primaria dérmica y sensibilización.

Esta norma clasifica al producto como no irritante, ligeramente irritante, muy irritante para la piel intacta y no tóxico, ligeramente tóxico y muy tóxico para la piel erosionada.^{13,15}

- **Prueba de inyección sistémica:**

Está diseñada para evaluar la respuesta biológica sistemática de los animales de laboratorio a los plásticos, elastómeros y otros polímeros mediante la inyección de dosis únicas de extractos de la muestra de prueba.

Para realizar la prueba se utilizaron 30 ratones albinos sanos, de un peso de 17 a 23 g y 3 conejos albinos.

Primero se lavó la muestra con ácido nítrico caliente y luego con agua, se colocó la muestra en el interior de una probeta de 100 ml de vidrio y se añadieron 70 ml de agua destilada, se agitó por 30 segundos y se drenó el agua. Este paso se repitió tres veces.

Después se secaron las piezas en un horno de calor seco a 50 °C por 15 minutos. Para la realización de esta prueba es necesario utilizar cuatro distintos medios extractantes: solución de cloruro de sodio al 0.9%, solución de alcohol en cloruro de sodio (1 en 20), polietilenglicol 400 y aceite vegetal (ajonjolí o de algodón). Para la preparación de los extractos, se colocó la muestra ya lavada en un envase de extracción distinto para cada medio y se agregaron 20 ml a cada uno, preparando un blanco con 20 ml de cada medio para inyecciones paralelas y comparaciones.

La extracción se realizó dejando las muestras en un horno a 70 °C durante 24 horas, después se dejaron enfriar a temperatura ambiente y fueron agitadas enérgicamente durante varios minutos.

Terminando la preparación de las muestras, por cada extractante (cloruro de sodio, alcohol y polietilenglicol) se inocularon 10 ratones; 5 para el grupo de prueba y 5 para el grupo control de la siguiente manera:

EXTRACTO BLANCO	DOSIS POR KG	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	VELOCIDAD DE INYECCION (μ L/S)
NaCl inyectable	50ml	Intravenosa	100
Solución de alcohol	50 ml	Intravenosa	100
Polietilenglicol 400	10 g	intraperitoneal	-

Tabla 4. Dosis, vía de administración y velocidad de inyección de los distintos medios extractantes.¹⁶

Para la administración de la muestra en extracto de aceite se inyectaron 0.2 ml por vía intracutánea en 10 sitios de la piel de cada conejo.

Se observó a los ratones a las 4, 24, 48 y 72 horas después de la inyección y si durante este periodo ninguno de los animales tratados con el extracto de la muestra, mostró una reacción biológica significativamente mayor que la de los animales tratados con el blanco, la muestra cumplió con los requisitos de la prueba.

Si dos o más ratones murieron o si se presentó un comportamiento anormal como convulsiones, postración, pérdida de peso mayor a 2 g, la muestra no satisface los requisitos de la prueba.

Los conejos fueron observados a las 24, 48 y 72 horas después de la inyección, registrando la presencia o no de eritema, escaras y edema, proporcionándoles un valor numérico a cada una de estas lesiones según la FEUM, para determinar si la muestra es apta para ser utilizada en un organismo o no.^{13,16}

- **Prueba intracutánea:**

Esta prueba está diseñada para evaluar respuestas locales a los extractos de materiales bajo prueba después de su inyección intracutánea en conejos, la preparación de los extractos se realizó igual que en la prueba de inyección sistémica.

Se utilizó un conejo albino de piel delgada libre de irritación y trauma mecánico, se rasuró el dorso, procurando abarcar un área extensa, la muestra se administró por vía intracutánea en 5 sitios de un lado de la columna vertebral a una dosis de 200 μ L por sitio y del otro lado por la misma vía y dosis, se administró el extracto control.

Los sitios de inyección se examinaron a las 24, 48 y 72 horas para detectar cualquier tipo de evidencia de reacción tisular como eritema, edema y necrosis, la calificación de las observaciones es la misma que la mencionada en la prueba de inyección sistémica.

Para considerar satisfactorios los resultados de la prueba, la reacción observada en las inyecciones de la muestra debió ser igual o de menor magnitud que las inyecciones control.^{13,16}

- **Otras pruebas**

También se realizó la prueba de pirógenos, que sigue el mismo protocolo utilizado en la UCPQByB con la diferencia de que después de insertar los sensores térmicos en el recto de los conejos se tomó la temperatura cada media hora por un lapso de 3 horas, tomando la última temperatura como control, se inoculó el producto y se monitorearon las consecuentes temperaturas cada media hora durante 2 horas más.

Otra de las pruebas que también se realizó fue la de seguridad general, realizada bajo los mismos parámetros que la efectuada en la UCPQByB.

3.3 LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD FISICOQUÍMICO Y BIOLÓGICO Y BIOTERIO DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD DE INTERVET MÉXICO, S.A DE C.V. SITIO SANTIAGO TIANGUISTENCO

Es una empresa certificada como Industria Limpia con base en la Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Auditoría Ambiental, expedido por la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, es una herramienta administrativa que comprende una evaluación integral sistemática, documentada y objetiva de como la empresa, su administración y su equipo se conducen con el objetivo de salvaguardar al medio ambiente.

La planta de Santiago Tianguistenco se dedica exclusivamente a la elaboración de biológicos aviares tanto de vacunas con virus vivos como de virus inactivados.

La estancia en esta empresa se realizó en el Departamento de Control de Calidad que está conformado por el Laboratorio de Control Químico y Microbiológico así como en el Bioterio.

Los procesos de manufactura en Intervet se realizan conforme indican las Normas sobre Medicamentos de la Unión Europea, así como las normas que establece SAGARPA para la realización de las distintas pruebas a sus productos y requisitos en general que deben de cumplir.

3.3.1 ÁREA DE LABORATORIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO

Se realizó un inventario de las sustancias utilizadas en el laboratorio de control físico- químico.

Se realizaron actividades como auxiliar analítico para el análisis en determinación de formaldehído en vacunas acuosas y emulsificadas. El formaldehído en solución, contiene metanol como agente estabilizante para prevenir la polimerización; esta solución no debe contener menos del 34% en peso y no más del 35% en peso de formaldehído, su inoculación en materia viva produce efectos adversos. Se colaboró con la medición de soluciones, pesaje y preparación de mezclas para la realización de la prueba con la vacuna Nobivac IA +N C 20000 DS[®] y determinar la cantidad de formaldehído.¹³

Se realizó el análisis de agua purificada empleada en la fabricación de vacunas liofilizadas, el agua es la sustancia más usada en la industria como aditivo para preparados o en las operaciones de limpieza durante la fabricación.

Existen diferentes tipos de agua para uso industrial, el tipo de agua utilizada en esta empresa es agua purificada y tiene las siguientes características: se usa como aditivo en los preparados, en operaciones de limpieza de equipos y en la síntesis de fármacos, debe cumplir con los requisitos establecidos en la monografía respectiva. Los sistemas de purificación, almacenamiento y distribución del agua deben protegerse de la proliferación microbiana.¹³

El agua purificada puede ser obtenida a partir de agua potable por un proceso de destilación, ósmosis inversa, tratamiento por cambio iónico u otro método apropiado y no contiene sustancias adicionales. Se utiliza como aditivo en la fabricación de preparados pero no debe emplearse como aditivo para la fabricación de inyectables. El agua purificada puede ser controlada por las pruebas que se realizan aquí y son las siguientes:

Determinación de pH (5-7), determinación de cloruros (máximo 0.5 ppm), determinación de sulfatos (el agua turbia presenta sulfatos), determinación de amoníaco (no más de 0.3 ppm), determinación de calcio (no más de 5 ppm), determinación de dióxido de carbono (debe ser una solución transparente), determinación de cloro total (no más de 0.25 ppm), no debe contener sustancias oxidables, determinación de la conductividad (1.1 $\mu\text{s}/\text{cm}$ a 20 °C), determinación de nitratos (no más de 0.2 ppm), determinación de sólidos totales (no más de 0.001%), no debe contener hierro ni más de 0.5 ppm de metales pesados.¹³

Se realizaron análisis de límites microbianos en agua, ya que no debe tener más de 100 UFC/ml de mesófilos aerobios. Se sembró 1 ml de la muestra de agua en placas BHI (infusión cerebro corazón), incubándolas durante 48 horas y por medio de filtración se determinó la cantidad de coliformes totales y pseudomonas presentes.

Se colaboró con la realización de medios de cultivo: TSA (agar tripticasa soya) y CTS (caldo tripticasa soya) pesando el principio activo y envasando el medio.

3.3.2 BIOTERIO

El bioterio cuenta con 12 casetas donde se mantienen aves en experimentación de la raza Legor de postura del tipo ALPES I (aves libres de patógenos específicos I). Aquí se realizan pruebas de inocuidad para bronquitis infecciosa, coriza infecciosa, encefalomiелitis aviar, enfermedad de Gumboro, enfermedad de Newcastle, laringotraqueitis aviar, paramixovirus, reovirus, síndrome de baja postura, síndrome de hepatitis hidropericardio y viruela aviar. Cuenta con medidas de bioseguridad dentro de las cuales se encuentra el uso de overol, botas y cofia para la permanencia en esta área.

3.3.2.1 ACTIVIDADES REALIZADAS

- **Manejo de embriones:**

Se recibieron los embriones y se colocaron en el cuarto de almacenamiento, el cual debe tener de 17 a 19 °C de temperatura y de 75 al 80% de humedad relativa, no sobrepasando los 14 días.

La nacedora se limpió y desinfectó con solución de cloro al 2%, ya que debe estar estrictamente limpio para conservar las características de SPF (libre de patógenos específicos) de los embriones.

Se trasladaron los embriones fértiles que tenían 18 días de incubación a las nacedoras (permanecen alrededor de 3 a 5 días, que es el tiempo que tardan en nacer).

- **Crianza y mantenimiento de las aves:**

Se prepararon las casetas para el traslado de las aves recién nacidas, se limpiaron con agua a presión, se dejaron ventilar por 24 horas y se abastecieron con cama seca de paja de avena.

Se colocaron focos de 250 watts para evitar un cambio de temperatura brusco, estableciendo una temperatura de 27 a 30 °C.

Se trasladaron las aves recién nacidas a una caseta limpia y se les proporcionó alimento y agua a libre acceso, las aves de menos de dos semanas de edad, se consideran en etapa de iniciación y la fórmula de su alimento debe estar basada en el 21% de proteína cruda, 9% de fibra cruda y 2% de grasa. Al alimento se le añade un coccidiostato y multivitamínico para contrarrestar el estrés. (Strepen vitaminado®). Sólo cuando las aves son nuevas y nunca durante una prueba.

Diariamente se les proporcionó agua y alimento a las aves y, dependiendo de la edad que tuvieran se les ofreció alimento acorde a su tiempo de vida, se consideran en etapa de crecimiento a las aves de más de dos semanas de edad y la fórmula de su dieta consiste en el 12% de proteína cruda, 8% de fibra cruda y 1.5% de grasa.

- **Obtención de muestras sanguíneas:**

Se realizó la punción intracardiaca de pollos de 3 semanas de edad obteniendo alrededor de 1.5 ml para la obtención de suero para pruebas serológicas, una vez obtenida la sangre, debe mantenerse a temperatura ambiente de 25 °C alrededor de 2 horas para la formación del coágulo, extraer suero y depositarla en microtubos eppendorf, con el suero obtenido se realizan pruebas de virus suero-neutralización o inmunodifusión en agar.

- **Prueba de inocuidad para vacunas aviares a virus vivo:**

Tiene como finalidad comprobar que el producto no provoque reacciones desfavorables en los animales, debido a la composición del mismo. Para asegurar su inocuidad se aplican varias veces la dosis normal a un grupo de aves SPF, se utilizaron diez aves de 10 a 15 días de edad, a las cuales se les inoculó el producto por vía conjuntival, aproximadamente 0.3 ml.

Después de haber inoculado el producto, los animales se observaron durante 21 días, anotando el estado de salud, terminado dicho periodo se verificó la ausencia de lesiones locales o sistémicas atribuibles a la vacuna, registrando los resultados en porcentaje de aves sanas del grupo.

Para considerar satisfactoria la prueba los 10 animales deben estar sanos o no presentar signos de enfermedad respiratorios o muerte.

- **Prueba de inocuidad para vacunas aviares monovalentes o polivalentes a virus inactivo:**

Tiene el mismo objetivo que la prueba anterior, para asegurar la inocuidad del producto se aplican 2 veces la dosis normal a un grupo de aves SPF.

Se utilizaron 10 aves de 3-4 semanas de edad, se les administró 2 ml del producto vía subcutánea en el tercio posterior del cuello, esta prueba tiene una duración de 14 días durante los cuales los animales fueron observados, al término de este periodo las aves en su totalidad deben estar sanas y no presentar problemas respiratorios o muerte, para que la prueba sea considerada satisfactoria.

3.3.3 ÁREA DE AISLADORES

Forma parte del bioterio, es un área de extrema seguridad donde se realizan los desafíos de las aves bajo prueba. Para conservar las medidas de bioseguridad es necesario realizar un cambio de ropa a la entrada, desinfectando el calzado en tapete sanitario y utilizando overol, botas, cofia, cubre bocas y guantes, al salir es necesario dejar toda la ropa y de ser necesario ducharse.

En esta área se realizan las pruebas de potencia donde se lleva a cabo la liberación de virus de campo (desafío) para bronquitis infecciosa, coriza infecciosa, Newcastle y síndrome de hepatitis hidropericardio, también se

realiza la preparación de anticuerpos puros, ya que es necesario un aislamiento completo de las aves experimentales del medio ambiente, condición que solamente se logra mediante una adecuada operación de las unidades de aislamiento.

Las aves en las aisladoras deben de tener una temperatura de 25-28 °C de los 15-21 días de edad y los mayores a una temperatura de 21-26 °C.

3.3.3.1 ACTIVIDADES REALIZADAS:

- **Alimentación de los animales:**

Se alimentó a las aves que se encontraban bajo prueba, el alimento se introduce por una trampa de agua con hipoclorito de sodio al 2%, la cual siempre debe tener un nivel suficiente para evitar transferencias de aire.

4. CONCLUSIONES

Tomando en cuenta las actividades desarrolladas en los distintos laboratorios en donde fue llevado a cabo el Trabajo Profesional en la Modalidad de Constatación de productos químicos y biológicos, se puede concluir que el objetivo establecido fue cumplido, haciendo énfasis en la realización de las pruebas de constatación requeridas por aquéllas empresas que producen medicamentos ya sea de uso humano o veterinario y que, necesitan asegurar que su utilidad prevista es adecuada mediante el cumplimiento de ciertos requisitos de control de calidad dentro de los cuales se encuentran los análisis de constatación en modelos animales.

El desarrollo de dichas pruebas permitió enriquecer el conocimiento adquirido durante la carrera de Médico Veterinario Zootecnista en el área de animales de laboratorio, aplicando las buenas prácticas de laboratorio y cuidando el bienestar de los animales.

Cabe señalar que siempre que éstos son utilizados como modelos experimentales, en este caso como sujetos de prueba, se tiene que considerar para el cumplimiento del objetivo de cada método, la aplicación del principio de las 3 R's de Russel y Burch, reduciendo la cantidad de animales por prueba, refinando la técnica al esclarecer los objetivos que se quieren lograr y detallar la metodología a seguir y de ser posible, reemplazando la técnica o los animales utilizados.

También es importante mencionar que en la actualidad existen diversos métodos alternativos que aplican el principio de las 3 R's y que siempre que sea posible, deben llevarse a cabo.

El Trabajo Profesional en ésta área crea un espacio de desarrollo como MVZ, pues es necesario implementar modificaciones en la legislación actual bajo la cual están regidas dichas pruebas e intentar actualizarlas con información reciente, pues en un futuro se prevé la no utilización de animales, al menos para la realización de éste tipo de pruebas.

Como parte del desarrollo del Informe Final del Trabajo Profesional en la Modalidad de Constatación de productos químicos y biológicos, se ha elegido la descripción de una técnica en específico, en este caso se hablará de “Seguridad General”, que será explicada en su totalidad a continuación.

II. DESCRIPCION DE LA PRUEBA DE SEGURIDAD GENERAL

1. SINONIMIA

Toxicidad Sistémica Aguda ^{5,17,18,19,20,21,22,23,24,25}

2. OBJETIVOS

- Comprobar que las muestras de prueba no son tóxicas para el ser humano o para los animales (en el caso de productos veterinarios).
- Detectar toxinas inesperadas e inaceptables que pudiesen haberse introducido durante su manufactura, o que se hubiese desarrollado durante el almacenamiento del producto. ¹³

3. FUNDAMENTO

Esta prueba tiene como fundamento el ensayo de letalidad aguda basada en la $DL_{50\%}$, o dosis letal media que es la cantidad de una sustancia obtenida estadísticamente y que administrada por vía sistémica, producirá la muerte al 50% de un grupo de animales de experimentación. ^{5,17,18,21,22,24}

El ensayo toxicológico define las condiciones que deben darse para que una célula biológica se vea afectada por una entidad química determinada y la naturaleza del efecto que se produce; esto se refiere a las condiciones que deben darse y pueden variar desde ser prácticamente inalcanzables en circunstancias ordinarias a ser tan fácilmente alcanzadas por una simple exposición de tejidos vivos a ciertas sustancias químicas y que produzca la destrucción de las células. Todos los efectos de las sustancias químicas en los tejidos vivos son resultado de una interacción entre cualquier entidad química dada y algún componente del sistema biológico. ^{18,26}

Para un clásico estudio $DL_{50\%}$, se utilizan ratones y ratas de laboratorio seleccionados típicamente por su bajo costo de manutención en comparación

con otros animales, proporciona información de la biodisponibilidad del compuesto, la actividad de un producto químico y su mecanismo de acción.

Generalmente se comienza con una dosis de investigación bajo condiciones agudas para la identificación de los peligros y riesgos en el contexto de la manipulación y el uso de los productos químicos.²¹ Los animales son dosificados y se observan muy de cerca durante las primeras 24 horas hasta por un periodo de 14 días.^{21,22}

En la actualidad es la base toxicológica para la clasificación de los productos químicos y, por lo tanto, es requerido por las autoridades gubernamentales en diferentes situaciones.²¹ Según la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) la clasificación de la toxicidad de los productos químicos se divide en: muy tóxicos: <5 mg / kg de peso corporal; tóxicos: > 5 <50 mg / kg; perjudiciales:> 50 <500 mg / kg, y no clasificados: > 500 <2000 mg / kg^{19, 21}

La toxicidad es la capacidad de una sustancia para causar daño a la salud de un organismo vivo, y la prueba de seguridad de la que se habla en este trabajo únicamente se refiere a la toxigenicidad inesperada del producto, pues con anterioridad cualquier muestra a la que se le realiza esta prueba, se le ha practicado ya la prueba de toxicidad intrínseca del producto que dependiendo de la actividad de las sustancias activas, se le ha clasificado con un grado de toxicidad.¹³

La toxicidad intrínseca del producto se refiere al daño que produce la sustancia activa de éste, de esta manera y a pesar de tener el mismo fundamento, la prueba de toxicidad aguda sistémica o seguridad general se lleva a cabo como requisito reglamentario según las Normas Oficiales Mexicanas de las cuales se hará mención posteriormente.

Esta prueba se realiza en productos farmacéuticos intermedios o terminados de uso humano y veterinario, así como a las materias primas de las distintas presentaciones comerciales, cuya vía de administración sea sistémica.²

4. DESARROLLO DE LA TÉCNICA

- **Sujeto de experimentación:**

Se utilizan 5 ratones albinos, sanos, de una cepa conocida (que no tenga predisposición genética a desarrollar toxicidad), que no hayan sido empleados

previamente para otro tipo de pruebas, del mismo sexo, identificados, con un peso de 17 a 23 g a menos que se indique otro en la monografía individual, como por ejemplo: 18 a 25 g para antibióticos, y de 19 a 21 g cuando la vía de administración utilizada sea oral, intraperitoneal o subcutánea.

Durante la prueba, cada grupo de ratones a los que se les administra una muestra, se albergan en una jaula apropiada con agua y alimento balanceado al libre acceso en un ambiente controlado con una temperatura de 20 a 24 °C.¹³

- **Material:**

Para la preparación del producto se utiliza material de cristalería (frascos, vasos de precipitados, pipetas), jeringas estériles, mechero, soporte universal con un cepo de contención y torundas con alcohol.

Según la vía de administración elegida, se utilizan distintos calibres de agujas, de 27 a 30 G para la vía intravenosa, de 23 a 27 G para la vía intraperitoneal, de 25 a 27 G para la vía subcutánea, para la vía oral se utiliza una sonda esofágica o una aguja calibre 18 G de 2.5 cm de longitud con punta roma.

En la monografía individual del producto se indica el procedimiento para la preparación de éste, de ser necesario reconstituirlo, se menciona el diluyente a utilizar (agua destilada estéril, solución salina estéril, goma acacia al 10%, o hidróxido de sodio al 0.05M), así como la dosis de prueba (concentración y volumen) y la vía de administración.¹³

- **Vía de administración:**

1. Intravenosa: Se coloca al animal en un cepo de contención y se desinfecta la cola con alcohol isopropílico dejando evaporar el exceso, se localiza la vena caudal lateral, se sujeta la cola del ratón y con la mano contraria se introduce la aguja dejando pasar la sustancia a una velocidad de 0.1 ml/seg. Es muy importante que la jeringa esté completamente llena con la cantidad adecuada del producto, evitando la formación de burbujas de aire predisponiendo la generación de un émbolo gaseoso.¹³
2. Intraperitoneal: Se sujeta al ratón por la cola, se coloca sobre una superficie en la cual pueda detenerse, con el dedo pulgar e índice se toma la piel de la parte superior del cuello y hombros, con los dedos

restantes se inmovilizan la cola y los miembros posteriores, el animal se coloca en decúbito dorsal en un ángulo de 45° de tal forma que el cráneo quede hacia abajo, esto permitirá un movimiento de las vísceras por acción de la gravedad, se inyecta en la cavidad peritoneal a través de la pared abdominal esto es, en la región abdominal baja lateral.¹³

3. Subcutánea: Se sujeta al animal como se indica en la vía intraperitoneal y se inyecta por debajo de la piel en la superficie dorsal.¹³
4. Oral: Debe sujetarse al animal como se describe en la vía intraperitoneal, se introduce la sonda por cavidad esofágica procurando no dañar el esófago ni introducir la sonda por tráquea, de una sola intención administrar la dosis especificada.¹³

Una vez inoculados por la vía de administración indicada, se identifica la caja donde se alojarán a los animales de prueba con el nombre del producto, número de lote, y fecha de inoculación.

Se observan durante un periodo de 48 horas después de la inyección o de un mayor tiempo si así lo especifica la técnica registrando la mortalidad.¹³

- **Requisitos para la aprobación del producto:**

Si todos los animales sobreviven al final de las 48 horas y no muestran signos de una reacción indicativa de un nivel de toxigenicidad anormal del artículo, los requerimientos de la prueba se satisfacen, si uno o más ratones mueren, la prueba debe repetirse con 10 ratones, la prueba será satisfactoria en caso de haber sido necesaria una sola repetición, si el número total de ratones muertos no excede del 10% del total de ratones utilizados.¹³

- **Eutanasia de los animales:**

Es necesario sacrificar a los ratones después de haber sido sometidos a la prueba de Seguridad General por motivos sanitarios, ya que se les administró una sustancia que pudo haber sido tóxica, además de que en caso de haberles causado un nivel de dolor, angustia y sufrimiento que haya sobrepasado el nivel esperado, es necesario elegir un método humanitario de sacrificio, entendiéndose éste como el sacrificio de un animal con el mínimo sufrimiento

físico y mental, tanto de éste como de la persona que lleve a cabo este procedimiento.⁷

Se recomienda realizar la eutanasia sin la presencia de otros animales, a menos de que grupos de éstos mueran al mismo tiempo, no debe interpretarse la inmovilidad como inconsciencia y después de aplicar la eutanasia es imperativo verificar la muerte del animal confirmando la cesación de signos vitales.^{7,27,28}

El sacrificio de los ratones sometidos bajo esta prueba, se realiza mediante un método físico que produce la inmediata pérdida de consciencia, el método utilizado para la eutanasia de los ratones es la dislocación cervical.^{7, 9}

La dislocación cervical manual ejecutada apropiadamente induce la rápida inconsciencia, se toma al animal por la base de la cola y se coloca sobre una superficie donde se pueda sostener, posteriormente se toma el cráneo con los dedos índice y pulgar de la otra mano o bien con un instrumento delgado y rígido, se ejerce tracción hacia atrás del animal a través de la base de la cola, para ocasionar la dislocación cervical.^{7,27,28}

Otros métodos que pueden utilizarse son: sobredosis de anestésicos inhalados (halotano, enflurano, isoflurano, dióxido de carbono y monóxido de carbono), inyectables (barbitúricos y T-61).^{7,27,28}

- **Manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos:**

Dentro de los residuos generados en esta prueba se encuentran los siguientes: jeringas, agujas, torundas con alcohol, residuos del producto y cadáveres.⁸

Los residuos no anatómicos como jeringas y material de curación, se disponen en bolsas de polietileno de color rojo.⁸

Los punzo cortantes que estuvieron en contacto con muestras biológicas como las agujas de jeringas desechables, se disponen en recipientes rígidos de polipropileno de color rojo.⁸

Los cadáveres se clasifican como residuos patológicos y deben disponerse en bolsas de polietileno de color amarillo.⁸

Los residuos de las sustancias utilizadas en la prueba, se disponen e identifican de acuerdo a sus características fisicoquímicas por medio de procedimientos como la neutralización de pH, solubilidad en agua y ausencia de colorantes, que permite desecharlos directamente en el drenaje, de manera

contraria, se disponen con una empresa encargada de darle el tratamiento adecuado.²⁹

El material de vidrio debe ser desinfectado con cloro al 2% por 24 horas, lavado con detergente Extran[®] y agua corriente, enjuagado con agua destilada y esterilizado a 250 °C por 30 minutos para ser dispuesto como residuo municipal.¹²

Todos los residuos tienen que ser identificados y envasados pertinentemente, los residuos no anatómicos y patológicos se almacenan temporalmente, si es necesario, en contenedores metálicos o de plástico con tapa y deben ser rotulados con el símbolo universal de riesgo biológico y con la leyenda “Residuo Peligroso Biológico Infeccioso” en un periodo de 7 a 30 días dependiendo del nivel de del establecimiento generador.

Los residuos patológicos deben conservarse en refrigeración a 4 °C. Después se recolectan y se transportan para darles un tratamiento adecuado por medio de métodos físicos o químicos que garantizan la eliminación de los microorganismos patógenos como la incineración, haciéndolos irreconocibles para su disposición final en los sitios autorizados.

Los RPBI's tratados se disponen como residuos no peligrosos en sitios autorizados por las autoridades competentes.⁸

5. BIOLOGIA Y CONDICIONES DE MANTENIMIENTO DE LOS RATONES DE PRUEBA

El ratón es un mamífero del orden *Rodentia* y de la familia *Muridae*. Su nombre científico es *Mus musculus*. Tienen una longevidad de 2 a 3 años y su vida reproductiva oscila entre los 12 y 18 meses; es decir, de 6 a 10 camadas.¹⁰

De acuerdo con la cantidad y periodicidad de sus estros, la hembra ratón se clasifica como poliéstrica continua, con ligeras variaciones estacionales en cuanto a fertilidad se refiere.

El primer estro se presenta a los 35 días de edad, se aconseja efectuar un apareamiento hasta los 50 días de edad o al alcanzar un peso corporal de 20 a 30 g,¹⁰ el ciclo estral tiene una duración de 4 a 5 días, donde el estro ocupa aproximadamente 12 horas.

Cuando se mantiene un grupo de hembras juntas puede presentarse un periodo de anestro continuo y al cabo de 72 horas, se produce una sincronización del estro, hecho que recibe el nombre de Efecto Whitten.^{10,11}

Para su reproducción se utiliza un sistema polígamo poniendo en contacto a un macho por cada dos hembras durante los cinco días que dura el ciclo estral de la hembra. Tanto la presencia de espermatozoides en los frotis vaginales, como la existencia de un tapón vaginal, formado por semen gelificado, son indicadores de que se ha producido la cópula en las 24 horas precedentes.

Las hembras presentan un periodo de gestación que oscila de 19 a 21 días y tomando en cuenta que presentan un estro post parto fértil después de 14 a 18 horas, pueden haber hembras gestantes y lactando, el periodo de gestación en las hembras lactantes aumenta de 3 a 10 días.^{10,11}

Las hembras cubiertas por un determinado macho no deben exponerse al contacto físico, ni al olor de otro diferente, al menos en las primeras 48 horas de gestación, ya que puede producirse reabsorción embrionaria, efecto denominado Bruce.¹⁰

El diagnóstico de gestación puede realizarse visualmente a partir del treceavo día, notándose en la hembra un aumento importante de peso y haciendo palpables los fetos,¹¹ a medida que avanza la gestación se observa el crecimiento gradual de las glándulas mamarias, que se hacen notorias a partir del día 14.

Inmediatamente antes del parto las hembras se llevan a jaulas individuales, el periodo de lactación tiene una duración de 4 a 6 semanas, el destete se efectúa cuando las crías alcanzan un peso de 15 g. Si después del estro post parto la hembra no fue apareada, ésta reiniciará su ciclo ovárico a los 5 días posteriores del destete, una vez destetados las crías son sexadas, el macho se distingue por la presencia de bolsas escrotales visibles, mayor distancia ano-genital y mayor tamaño de la papila genital en comparación con la hembra.^{10,11}

Una vez sexados, se alojan en jaulas de plástico provistas de tapas de acero inoxidable, se les proporciona agua y alimento a libre acceso y se les mantiene en las condiciones ambientales y características mencionadas en punto 3.1.1.1

Cuando los animales son requeridos para la prueba son pesados y marcados temporalmente, al término de la prueba los animales son sacrificados.¹³

6. REGLAMENTACION

La prueba de Seguridad General es solicitada por las empresas que fabrican medicamentos de uso humano y veterinario, ya que deben asegurar que éstos son adecuados para su uso, cumpliendo con ciertos requisitos.

Existen normas de correcta fabricación de medicamentos que se refieren a la producción y al control de calidad de sus productos, dichas normas incluyen la realización de los ensayos necesarios y pertinentes para aprobar la distribución y venta de los productos que elaboran.¹

Por reglamentación, el artículo 195 de la Ley General de Salud, establece que la Secretaría de Salud es la encargada de emitir las Normas Oficiales Mexicanas a que debe sujetarse el proceso y especificaciones de los productos químicos y biológicos de uso humano (medicamentos y demás insumos para la salud) y que estarán normados por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.³

Para productos de uso veterinario se siguen los lineamientos descritos en las Normas Oficiales Mexicanas emitidas por la SAGARPA.⁴

En la Norma Oficial Mexicana NOM-063-ZOO-1999, se mencionan las especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en animales domésticos y uno de los requisitos para obtener el registro, es la realización de pruebas de control de calidad tanto del producto en proceso como del terminado, dentro de las cuales se encuentra la Prueba de Seguridad.³⁰

En la Norma Oficial Mexicana NOM-012-ZOO-1994, se establecen las especificaciones para la regulación de productos químicos farmacéuticos, biológicos y alimenticios para el uso o consumo de los animales.²

Dentro de las consideraciones generales se menciona que cada lote de producto terminado elaborado en el país donde se pretende comercializar, así como las materias primas e ingredientes activos, deben analizarse en un laboratorio de control de calidad de acuerdo con los métodos analíticos descritos en la última edición de la FEUM u otra farmacopea internacional.² Los productos de la forma farmacéutica veterinaria que vengan en polvo solución o electrolitos inyectables deben someterse a la Prueba de Seguridad General.²

Dentro de los laboratorios que pueden realizar ésta prueba, se encuentran las Unidades de Verificación y los Laboratorios de Pruebas como los Laboratorios

Auxiliares en el Control Sanitario de los productos de uso y consumo humano o veterinario.

Un laboratorio de prueba de control de calidad es aquél donde se desarrollan las actividades o procedimientos que obedecen a un programa continuo de aseguramiento de la calidad de un producto por lote producido, con el fin de verificar que cumplan con la calidad requerida; reflejando el cumplimiento de las especificaciones que se diseñan en la orden de producción y que deben coincidir con los señalamientos de la etiqueta de un producto.³¹

Una unidad de verificación efectúa una serie de procedimientos mediante los cuales se verifica que el producto cumple con las especificaciones de calidad presentadas por el laboratorio productor, debiendo reflejar las especificaciones que se diseñan en la orden de producción y que deben de coincidir plenamente con los señalamientos de la etiqueta de un producto y con las normas oficiales mexicanas aplicables.³¹

En la Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, se mencionan las características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas.³¹ Y en la Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, se establecen los criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria³²

En el Reglamento de Insumos para la Salud de la Secretaría de Salud, en el título séptimo se menciona un capítulo referente a los Terceros Autorizados; como personas físicas y personas morales en general (laboratorio de prueba y unidades de verificación), autorizados para emitir dictámenes respecto del cumplimiento de requisitos establecidos por la propia Secretaría o en las Normas correspondientes, para realizar estudios con efectos de trámites o autorizaciones sanitarias.³³

La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), órgano desconcentrado de la Secretaría de Salud en la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC) realiza una convocatoria para operar como Tercero Autorizado y poder ofrecer un servicio de control analítico de medicamentos, y para tal caso, es necesario cumplir los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración que se mencionan en la Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006.³⁴

7. REQUISITOS DE LA PRUEBA Y DEL FORMATO DE REPORTE DE RESULTADOS DE LA PRUEBA SEGÚN LA NMX-EC-17025-IMNC-2006³⁵

Esta norma establece los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

Se menciona que el laboratorio de pruebas debe aplicar métodos y procedimientos apropiados para todas las pruebas dentro de su alcance que incluyen el muestreo, manipulación, transporte, almacenamiento y preparación de las muestras a probar, así como la estimación de la incertidumbre, de la medición y las técnicas estadísticas para el análisis de los datos de las pruebas.

El laboratorio debe tener instrucciones para el uso y funcionamiento de todo el equipamiento necesario, así como para la manipulación y preparación de los ítems a probar y que todas las instrucciones, normas, manuales y datos de referencia correspondientes al trabajo del laboratorio, se deben mantener actualizados y deben estar fácilmente disponibles para el personal.

Las desviaciones respecto de los métodos de ensayo deben ocurrir solamente si la desviación ha sido documentada, justificada técnicamente, autorizada y aceptada por el usuario.

El laboratorio debe utilizar los métodos de prueba que satisfagan las necesidades del usuario y que sean apropiados para los ensayos que realiza, se deben utilizar preferentemente los métodos publicados como normas internacionales, regionales o nacionales. El laboratorio debe asegurarse de que utiliza la última versión vigente de la norma, a menos que no sea apropiado o posible, cuando sea necesario, la norma debe ser complementada con detalles adicionales para asegurar una aplicación coherente.

Cuando el usuario no especifique el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados que hayan sido publicados en normas internacionales, regionales o nacionales, por organizaciones técnicas reconocidas, o en libros o revistas científicas especializados. De ser necesario utilizar un método no normalizado, este debe ser acordado con el usuario y debe incluir una especificación clara de los requisitos del usuario y del objetivo de la prueba, el método desarrollado debe haber sido validado adecuadamente antes de su uso.

El procedimiento del método debe incluir: una identificación apropiada, el alcance, la descripción del tipo de producto a probar, los parámetros, magnitudes y rangos a ser determinados, los aparatos y equipos (incluyendo los requisitos técnicos del funcionamiento), los patrones y materiales de referencia (de ser necesarios), las condiciones ambientales requeridas y cualquier periodo de estabilización que sea necesario. Para la descripción del procedimiento debe incluirse: la colocación de las marcas de identificación, manipulación, transporte, almacenamiento y preparación de los productos, las verificaciones a realizar antes de comenzar el trabajo, la verificación del correcto funcionamiento de los equipos y, cuando corresponda, la calibración y ajuste antes de cada uso, el método registrado de las observaciones y de los resultados y las medidas de seguridad a observar, así como los criterios para la aprobación o rechazo, datos a ser registrados, el método de análisis y presentación, la incertidumbre o el procedimiento para estimarlo.

Los resultados de cada prueba deben ser informados en forma exacta, clara, no ambigua y objetiva, de acuerdo con las instrucciones específicas de los métodos de ensayo. Deben ser reportados, por lo general, en un informe de prueba y debe incluir toda la información requerida por el usuario y necesaria para la interpretación de los resultados de la misma, así como toda la información requerida por el método utilizado.

Cada informe de prueba debe incluir la siguiente información: título del ensayo, nombre y dirección del laboratorio, lugar donde se realizaron los ensayos, identificación única del informe de prueba y en cada página un señalamiento para asegurar que forma parte de éste, así como una clara identificación del final del mismo. También debe incluir el nombre y la dirección del usuario, el método utilizado, una descripción, la condición e identificación no ambigua de los productos de prueba, la fecha de recepción y ejecución de los productos sometidos a ensayo, una referencia al plan y a los procedimientos de muestreo utilizados por el laboratorio (de ser necesarios), los resultados de los ensayos con sus unidades de medida, el o los nombres, funciones y firmas de las personas que autorizan el informe del ensayo y cuando corresponda, una declaración de que los resultados sólo están relacionados con los productos que se probaron.

Además de dichos requisitos, también deben incluirse las desviaciones, adiciones o exclusiones del método de prueba e información sobre las condiciones de prueba específicas, tales como condiciones ambientales, una declaración sobre el cumplimiento o no de los requisitos o especificaciones, una declaración sobre la incertidumbre de medición estimada y cuando sea apropiado y necesario opiniones e interpretaciones, claramente identificadas como tal en el informe del ensayo.

La presentación de los informes elegida debe ser concebida para responder a cada tipo de ensayo y para minimizar la posibilidad de mala interpretación o mal uso. Las modificaciones de fondo a un informe de ensayo después de su emisión, deben ser hechas solamente en la forma de un nuevo documento o de una transferencia de datos que incluya la declaración: "Suplemento al Informe de Ensayo", cuando sea necesario emitir un nuevo informe, éste debe ser inequívocamente identificado y debe contener una referencia al original al que reemplaza.³⁵

8. TECNICAS ALTERNATIVAS DE LA PRUEBA DE SEGURIDAD GENERAL

Los ensayos de toxicidad en animales normalmente implican la exposición de una muestra de la prueba y de observación de los animales o los signos de toxicidad por un período determinado. Si se produce toxicidad antes del final de la fecha prevista para su estudio, se puede producir en los animales dolor y angustia como consecuencia del daño tisular localizado o daños sistémicos de toxicidad en diversos órganos y tejidos, tomando en cuenta que dichos efectos adversos pueden también ser causados durante el mismo ensayo de toxicidad aguda.^{5,20} La aplicación de este procedimiento es a menudo necesaria por legislación nacional, internacional o directrices de reglamentación sanitaria, de esta manera la aplicación del principio de las tres R's (reducción, refinamiento y reemplazo) para las pruebas de toxicidad, representan una dificultad considerable tanto para los políticos, toxicólogos, abogados o científicos comprometidos con el desarrollo de pruebas relevantes y confiables que no se realicen en animales.^{20, 25}

En diferentes foros internacionales durante las dos últimas décadas, se ha descrito la necesidad de determinar una alta exactitud estadística en el valor $DL_{50\%}$.²¹

Las directrices de la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico), describen métodos bien establecidos y validados de alternativas que reducen el sufrimiento de los animales o que utilizan un número mucho menor de animales (reducción), sin embargo, estos métodos pueden ser considerados adaptaciones de las deficiencias de las determinaciones del valor DL_{50%}, en lugar de intentar mejorar el valor científico de estudios cuantitativos de toxicidad sistémica aguda.^{20, 21, 25, 36}

Tres alternativas de reducción y refinamiento han sido aceptadas en las directrices de la OCDE para los ensayos de los productos químicos: procedimiento de dosis fija, método de clasificación de toxicidad aguda y procedimiento arriba-abajo (aún no validado).^{22, 23, 24} Además, a finales del 2000, la OCDE propuso una prohibición de la clásica prueba DL_{50%}, que también ha sido prohibida en todos los países de la Unión Europea.^{6, 22, 24}

En México se sigue practicando esta prueba, debido a que no ha habido cambios en la reglamentación, basada en los métodos analíticos generales que establece la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, además de que para la práctica de los profesionistas que realizan esta prueba, significa una obligación y por dicha razón, a pesar de la existencia de nuevas alternativas para el desarrollo de ésta prueba, los nuevos métodos representan progreso técnico, considerándolos como avanzados o adicionales, en lugar de métodos alternativos.²³

A continuación se presentan los tres métodos validados como alternativos para realizar la prueba de toxicidad:

- **Procedimiento de dosis fija:**

El procedimiento de dosis fija se propuso por primera vez en 1984 por la Sociedad de Toxicología Británica, después de la validación internacional de un estudio que incluía 20 químicos de referencia probados en 31 laboratorios de 11 diferentes países, el procedimiento fue incorporado a la reglamentación de la OCDE (directriz 420) en 1992. Los resultados de la validación del estudio mostraron una notable coherencia entre los laboratorios y se concluyó que la información generada podría ser utilizada tanto para la evaluación de riesgo como para la clasificación de productos. La sustancia de prueba es ofrecida en uno de los cuatro niveles de dosis fija

(5, 50, 500 y 2000 mg/kg) a 5 machos y 5 hembras. El objetivo es identificar la dosis con la cual se producen signos claros de toxicidad pero no la mortalidad, dependiendo de los resultados de la primera prueba, aunque no sea necesario, una dosis mayor o menor debe ser probada. Si la mortalidad ocurre, se debe probar una vez más con una dosis menor (excepto si la dosis original elegida es de 5 mg/kg). Si ningún signo de toxicidad ocurre con la dosis inicial, es necesario volver a probar la sustancia pero con una dosis mayor. Los resultados son interpretados en relación con los animales sobrevivientes y la toxicidad evidente, haciendo posible asignar al químico una de las categorías de clasificación de la OCDE.^{21, 24}

- **Método de clasificación de toxicidad:**

El método de clasificación de toxicidad ha sido validado internacionalmente, el último estudio incluía 20 sustancias de prueba en 9 laboratorios de 5 países, el método está descrito en la directriz 423 de la OCDE y está basado en la asignación de la letalidad. En un principio 3 animales son dosificados con uno de los tres niveles de dosis fija para los límites de clasificación de la toxicidad oral DL_{50%}. El propósito de este procedimiento es identificar el mínimo nivel de dosificación que cause la muerte de 2 o 3 animales. 3 animales de un mismo sexo son dosificados en el nivel medio. Si 2 o 3 animales mueren, se vuelve a dosificar con el mínimo nivel de dosis. Cuando menos de 2 mueren, la prueba se repite con el mismo nivel de dosificación, pero con otro sexo. Si 2 o 3 animales mueren en este paso, la prueba se repite con el mínimo nivel de dosificación, y si menos de 2 mueren, la prueba se repite con el máximo nivel de dosis. Varios estudios han evaluado el método haciéndolo una alternativa valiosa para la clasificación de productos químicos.^{21, 24}

- **Proceso “arriba-abajo”**

En este tipo de procedimiento se utiliza un solo animal (a veces hasta 2 o 4 animales) que se exponen con subsecuentes dosis ajustadas hacia arriba o hacia abajo por un factor constante en función del resultado de la dosis previa. Si un animal muere durante el primer paso de esta prueba, a otro animal se le ofrece una dosis reducida por un factor, si la exposición de ésta

no resulta en toxicidad, la dosis es elevada por un factor constante equivalente, hasta que 5 animales hayan sido dosificados o se llegue a la dosis límite. A pesar del tiempo empleado, el procedimiento arriba-abajo puede ofrecer buenos resultados con el uso de menos de 6 a 9 animales.^{21,}

24

8.1 OTRAS ALTERNATIVAS

Los actuales ensayos *in vivo* en animales de laboratorio se realizan de acuerdo con la reglamentación vigente, tomando en cuenta que los datos obtenidos de los resultados de varias pruebas, entre ellos la de toxicidad, casi inevitablemente requiere de la extrapolación de dichos datos a adaptaciones para los seres humanos o para otros animales, debido a que existen diferencias en cuanto al metabolismo de dichas sustancias en distintos organismos.¹⁹

La evaluación del futuro, de los riesgos de salud por el consumo de ciertos productos en seres vivos, será cada vez más enfocada a confiar en la participación inteligente de las estrategias de experimentación *in silico* y a sofisticados procedimientos *in vitro*, un examen de la información pertinente mecanicista de los estudios moleculares, y al uso de biomarcadores de susceptibilidad en cuanto a la exposición y el efecto de importancia directa para la salud de los humanos. Los ensayos con animales serán suplantados por completo o se convertirán en un último recurso.^{20, 26.}

Estudios recientes sugieren que los métodos *in vitro* pueden ser útiles en la predicción de la toxicidad aguda. El MEIC[®] (Multicentro de Evaluación de Citotoxicidad *in vitro*), organizado por científicos suecos, es un programa de base de datos donde participan docenas de laboratorios de todo el mundo; contiene datos *in vitro* de 50 productos químicos de referencia, así como la metodología de distintos ensayos *in vitro* obtenidos por medio de determinaciones de la dosis letal aguda de dichas sustancias en células sanguíneas humanas, además de los datos DL_{50%} en ratones. Utilizando esta información puede predecirse la toxicidad en otros organismos vivos, sin embargo no todos los estudios *in vitro* realizados, han sido validados para determinar si son confiables y generar información suficiente para satisfacer los requisitos reglamentarios para ensayos de toxicidad aguda.^{21, 22, 24}

También existen métodos *in silico*, basados en programas computacionales llamados Q SAR (relaciones cuantitativas estructura- actividad) considerados sistemas expertos para interpretar la información existente sobre un producto químico y se basa en el análisis matemático de reacciones fisicoquímicas utilizando información acerca de una molécula y su estructura y, por medio de distintas ecuaciones se establece una relación con el mecanismo de acción de una sustancia química y por lo tanto de los compuestos estructuralmente relacionados. Se utilizan para hacer predicciones sobre una base de información previa de la toxicidad que puede ser producida por ciertas sustancias.^{17, 22, 23}

Algunos de dichos programas son CASE/MCASE/CASETOX[®] o TOPKAT[®], son paquetes estadísticos de varios modelos Q SAR que se desarrollaron experimentalmente utilizando valores derivados de la DL_{50%} para más de 4000 productos químicos y evalúan la toxicidad para una serie de clases de químicos.²²

Actualmente existe un proyecto denominado A-CUTE-TOX[®] que tiene como objetivo desarrollar un sistema sencillo *in vitro* con estrategias de ensayo para la predicción de la toxicidad sistémica aguda humana, que podría sustituir las pruebas de toxicidad aguda animal utilizada en la actualidad para fines normativos; incluye el desarrollo de cultivos celulares y sistemas *in silico*, así como modelos de predicción que relacionen mejor las concentraciones del cultivo de células de los productos químicos a las dosis *in vivo*.²²

También está el proyecto llamado PREDICTOMICS[®]; destinado a desarrollar a corto plazo ensayos *in vitro* de toxicidad a largo plazo y tiene como objetivo identificar los principios de mecanismo de la toxina.²²

La evaluación de la toxicidad aguda de sustancias químicas no debe implicar el envenenamiento de animales innecesariamente, es por eso que se espera que con todas estas nuevas propuestas, se realice una base de datos de la toxicidad aguda de los estudios en animales que ya están disponibles para muchos de los productos químicos existentes. Estos datos deben ser publicados y a pesar de las regulaciones, se debe tener en cuenta que las diferencias entre las especies dificultan la extrapolación de información a los seres humanos. Los datos existentes sobre la toxicidad aguda en humanos, por ejemplo, de los registros de accidentes de envenenamiento, de necropsias o

proporcionada por clínicas médicas, debe prevalecer sobre los datos de animales y debe ser responsabilidad de todas las fuentes posibles. Los datos en humanos y los datos obtenidos de los estudios *in vitro*, se deben utilizar para clasificar y etiquetar los productos químicos.

Cabe señalar también que para realizar una evaluación más completa de la toxicidad aguda, en algunos casos, se debe tomar en cuenta la farmacocinética y toxicocinética del fármaco, así como tomar en cuenta los niveles plasmáticos.^{22, 23}

La investigación necesaria para completar los ensayos sin animales debe ser prioridad de las autoridades internacionales competentes.²¹

9. PRINCIPIOS GENERALES DE BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Esta parte describe las prácticas correctas de laboratorio para la realización de estudios no clínicos que apoyan la investigación o las solicitudes de permisos de comercialización para los productos regulados por la Food and Drug Administration (FDA), incluidos los medicamentos humanos y de animales, así como productos biológicos.³⁷

La implementación de programas de control y garantía de calidad apoyados en buenas prácticas de laboratorio, son los instrumentos más apropiados para asegurar la validez del trabajo del mismo. Los lineamientos generales sobre buenas prácticas de laboratorio son esencialmente, un conjunto de recomendaciones que se basan en la aplicación de principios científicos, técnicos y fundamentalmente de sentido común, al administrar el laboratorio de control de calidad tanto en aspectos generales como en la realización de actividades.^{13, 38}

Por ello, la principal tarea de un laboratorio de control es la adecuada implementación de un sistema de calidad definiendo claramente su estructura organizacional, responsabilidades, procedimientos, procesos y recursos para garantizar la integridad de los resultados así como su confiabilidad.^{13, 37, 38}

Para llegar a ello es necesario tomar en cuenta los siguientes puntos:

- **Organización:**

El establecimiento debe contar con una organización interna acorde con el tamaño del laboratorio, debe contar con un organigrama detallado que permita

comprender entre otras cosas, las relaciones existentes dentro de la estructura, facilitando la toma de decisiones y asignación de responsabilidades.^{13, 37, 38}

- **Personal:**

El laboratorio debe contar con personas responsables con experiencia suficiente de acuerdo a las necesidades del puesto en cada área, personal profesional analista, personal auxiliar capacitado y personal de apoyo. Todos deben recibir capacitación suficiente relativa a las políticas, objetivos, reglamentos internos de la empresa y entrenamientos, así como capacitación mediante cursos de actualización, seminarios, reuniones y talleres internos y externos, documentando el adiestramiento recibido, también se debe contar con un sistema de evaluación constante que permita conocer el desempeño del personal de acuerdo a las responsabilidades y funciones de cada puesto, así mismo la documentación del éste.^{13, 37, 38}

- **Instalaciones:**

El diseño del laboratorio debe cumplir con los requerimientos técnicos para el adecuado flujo de personal, materiales, equipo y muestras, respondiendo a las exigencias de seguridad que permitan el manejo de sustancias peligrosas, así como la evaluación adecuada del personal en caso de emergencia. El espacio debe ser suficiente para que los analistas realicen su trabajo de acuerdo a las normas de seguridad correspondientes.^{13, 38}

- **Áreas:**

La organización de las áreas y su clasificación dentro del laboratorio dependerá de las actividades que se desarrollen en el mismo. Para el área de análisis de biológicos, farmacológicos y toxicológicos es importante que este equipado para efectuar pruebas *in vitro* e *in vivo*, y responder a los requisitos exigidos por el tipo de análisis y pruebas que se realicen. En estas áreas se efectuarán las pruebas para pirógenos, seguridad, bioensayos y otras pruebas farmacológicas y toxicológicas requeridas para los análisis.¹³

El diseño de las instalaciones del bioterio debe realizarse de acuerdo al tipo y variedad de animales requeridos por las pruebas que se realicen, con objeto de

lograr una disposición que permita mantener a los animales separados mediante barreras físicas adecuadas.

También debe de contar con una área de lavado y preparación de material, un área de servicios administrativos, un espacio para albergar la bibliografía actualizada pertinente al control de fármacos, aditivos y medicamentos, un área de almacenamiento de los materiales y herramientas necesarias para el mantenimiento y reparación de los equipos e instrumentos de uso en los análisis, un área de documentación donde se desarrollarán las tareas relacionadas con la elaboración, duplicación, actualización, distribución interna y archivo permanente de los documentos maestros que describen las especificaciones de los productos, métodos analíticos y los procedimientos normalizados de operación.^{37, 38}

- **Equipos e instrumentos:**

Cada equipo e instrumento debe contar con un manual que incluya la siguiente información: instalación y operación, mantenimiento, fecha de calibración, lista de accesorios de repuesto y limpieza. Cada instrumento o equipo debe contar con registro de los servicios o mantenimiento efectuado, correctivos o preventivos, anotando si el servicio fue realizado por técnicos especializados externos o personal de laboratorio y deben ser sometidos a una calibración periódica para verificar su exactitud, sensibilidad y reproducibilidad.^{13, 38}

- **Reactivos:**

Todos los reactivos que se usan en un laboratorio de control de calidad deben ser de calidad analítica certificada y reconocida. Como medida de seguridad, se debe disminuir al mínimo práctico y conveniente la calidad de sustancias químicas, medios de cultivo, etcétera., mantenidas en el laboratorio analítico, como forma de contribuir al uso racional con criterios de control y contención de gasto. Todas las soluciones y reactivos deben estar adecuadamente identificadas.^{13, 37, 38}

- **Muestras:**

La toma de muestras (cuando sea necesario), deberá obedecer en lo posible a las condiciones del plan de muestreo y a las razones de análisis requerido en

cada caso particular, atendiendo a alcanzar la representatividad de la muestra respecto del todo del cual fue extraída, con base en claros criterios estadísticos y a los aspectos técnicos señalados de la bibliografía internacional. Las muestras deberán ser recibidas en el área destinada a este efecto y deben tener una solicitud de análisis por escrito, el laboratorio debe contar con un procedimiento para la distribución de trabajo conforme a las características de las muestras y a las razones de los análisis requeridos, así como para el registro de éstas al momento de su recepción, almacenamiento, elaboración del protocolo necesario para su distribución interna, resguardo de muestras de retención que asegure la integridad de la información y de la misma. Una vez recibida la muestra, se debe emitir una orden de análisis, terminado éste, el analista debe redactar el certificado en el que aparezcan todos los datos consignados en la fecha de registro de la muestra, tiene que reportar todos los resultados obtenidos de las pruebas a las que se sometió el producto.^{13, 37, 38}

- **Ensayos y análisis:**

El laboratorio debe poseer un repertorio de especificaciones y métodos analíticos de cada uno de los componentes y productos que se manejan, incluyendo la toma de muestras, además de una colección de farmacopeas y documentos similares, que deben actualizarse permanentemente. Los trabajos de evaluación, desarrollo y validación analítica deben basarse en protocolos que describan minuciosamente los objetivos, metodología, diseño experimental, descripción de procedimientos, frecuencia de ensayos, información sobre la calificación y condiciones de trabajo. Se debe redactar un informe final de los estudios de evaluación con las conclusiones y recomendaciones y la firma de los responsables del análisis.^{13, 37, 38}

- **Procedimientos normalizados de operación:**

Las actividades regulares del laboratorio deben realizarse conforme a procedimientos normalizados de operación que describan por escrito, en forma minuciosa, las operaciones y los controles que deben realizarse en cada caso específico destinados a asegurar la confiabilidad de los resultados generados en el curso del trabajo analítico. Deben contener como mínimo la siguiente información: objetivo, alcance, responsabilidad, desarrollo del proceso y

referencias bibliográficas, la firma de las personas que lo elaboran, revisan y autorizan, así como un número secuencial que refleje las actualizaciones que se realicen, la fecha de emisión, actualizaciones y aplicaciones.

Además de redactarse los procedimientos referentes a:

- Recepción, preparación, identificación y almacenamiento de las sustancias,
- Toma, recepción, identificación, distribución interna, conservación, mantenimiento, utilización y reserva de los productos sometidos a análisis.
- Recepción, identificación, distribución y preparación de reactivos.
- Uso mantenimiento, limpieza y calibración de los aparatos de medición y control del medio ambiente.
- Limpieza e higiene de los diferentes locales.
- Distribución del trabajo, recopilación de datos y preparación de informes analíticos, sistema de ordenamiento, mantenimiento y manejo de los archivos de información.
- Manipulación, registro, procedimientos de entrega y recepción de materiales de depósito y bodegas conforme a las características de cada tipo de producto.
- Procedimientos unitarios utilizados en el laboratorio de análisis.
- Procedimientos de auditoria, inspección y análisis del control en el programa de garantía de calidad.
- Procedimientos de la compra, cría, mantenimiento, cuarentena, alimentación, transporte, uso humanitario y disposición de los animales de laboratorio.
- Manejo y eliminación de desechos, limpieza de material y uso de elementos de seguridad en el trabajo incluyendo los procedimientos en casos de accidente o desastres.^{13, 37, 38}

- **Programa de seguridad:**

Deben implementarse programas de seguridad con el fin de proteger la integridad de las instalaciones y equipos, de las muestras, del medio ambiente y comunidad y de la salud de los trabajadores. La seguridad en el trabajo del laboratorio depende de la disciplina y del adecuado uso de procedimientos

normalizados de operación por cada miembro del personal, el laboratorio debe contar con procedimientos escritos y reglas de conducta, recomendando de manera general, prohibiciones, precauciones, entrenamientos o adiestramientos necesarios.^{13, 37, 38}

- **Auditorías:**

El laboratorio debe poseer un programa de control y garantía de calidad analítica con el propósito de establecer y mantener normas elevadas de calidad en el trabajo. Debe ser conducido por una unidad separada; cuando no sea factible, debe incluirse en el plan de trabajo de los analistas de cada área y designar a un profesional para constituir un comité con el fin de señalar, implementar, controlar y evaluar el programa, el cual no debe estar personalmente involucrado en los trabajos rutinarios que se evalúan.

La unidad debe realizar auditorias para evaluar el trabajo analítico de las diferentes áreas, incluyendo la verificación del uso apropiado de las instalaciones y equipos con el fin de observar el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio, presentando por escrito dichas evaluaciones incluyendo las observaciones necesarias en un informe.^{13, 37, 38}

10. BIBLIOGRAFÍA Y FUENTES DE CONSULTA:

1. Norma Sobre Medicamentos de la Unión Europea. Volumen 4 Normas de Correcta Fabricación. Comisión Europea. Dirección General III-Industria. Procedimientos farmacéuticos y cosméticos. Directiva 91/412/CEE. 1999.
2. Norma Oficial Mexicana NOM-012-ZOO-1993, Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Ley pub. (Enero, 17, 1995)
3. Ley General de Salud. Ley pub. Artículo 195. (Febrero, 18, 2007)
4. <http://www.sagarpa.gob.mx/D99/NOM.html>
5. Stokes W S. Humane Endpoints for Laboratory Animals Used in Regulatory Testing *ILAR J.*2002 43 (Suppl).31-38
6. Spielmann H. Animal Use in the Safety Evaluation of Chemicals: Harmonization and Emerging Needs. *ILAR J.*2002 43 (Suppl.) 11-17.
7. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ley pub. (Junio, 18, 2001)
8. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Ley Pub. (Febrero, 17, 2003).
9. PRP-UCPQByB-MV-002. Procedimiento del manejo reproductivo de las colonias de la UCPQByB. 2 ed. Octubre, 2007.
10. Harkness JE, Wagner JE. The Biology and Medicine of rabbits and rodents. 4ed. Williams & Wilkins. 1990
11. Fox JG, editor. Laboratory Animal Medicine. 2 ed. ACLAM Series. 2002.
12. PRP-UCPQByB-MV-003. Procedimiento de realización de pruebas de constatación en la UCPQByB. 3 ed. Octubre, 2007.
13. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Octava Edición Vol. 1 y 2. 2004.
14. Cunningham JG, Fisiología Veterinaria Interamericana. México: 1999 McGraw-Hill.

15. Norma Oficial Mexicana NOM-039-SSA1-1993, Bienes y servicios. Productos de perfumería y belleza. Determinación de los índices de irritación ocular, primaria dérmica y sensibilización. Ley pub. (Marzo, 10, 1995)
16. Métodos generales de análisis. Determinación del grado de aceptación, pruebas biológicas y fisicoquímicas para productos elaborados con materiales plásticos, látex u otros elastómeros de origen natural o sintético. Parte I. Pruebas biológicas. Subdirección General de Abastecimiento. Jefatura de Control de Calidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. 1988.
17. Ballantyne TM, Syversen T. General and Applied Toxicology. Gran Bretaña:Macmillan Reference Ltd., 1999
18. Loomis TA. Fundamentos de Toxicología. España: Acribia. 1982.
19. Workshop Report and Test Method Recommendations. Report of the International Workshop on *In Vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity: Results of an International Workshop Organized by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) NIH Publication No. 01-4499. August 2001.
20. Balls M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing *Lab Anim*. 1994:28 193-211.
21. Walum E. Acute oral toxicity. *Environ Health Perspect*. 1998: 106 (Suppl 2)497-503
22. Langley G Acute Toxicity Testing Without Animals. "More scientific and less of a gamble". European Coalition to End Animal Experiments. 2005: 3-21
23. Bhogal N, Grindon C, Combes R, Balls M. Toxicity testing: creating a revolution based on new technologies. *Trends in Biotech*. 2005: 23 (6) 299-307.
24. Botham P A. Acute Systemic Toxicity. *ILAR J*.2002. 43 (Suppl.) 27-30.
25. Richmond J. Refinement, Reduction, and Replacement of Animal Use for Regulatory Testing: Future Improvements and Implementation Within the Regulatory Framework. *ILAR J*.2002 43 (Suppl.).63-68

26. Córdoba D. Toxicología. 5 ed. Colombia: Manual moderno. 2006.
27. Working Party. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Lab Anim* 1996;30: 293–316.
28. Working Party. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Lab Anim* 1997;31: 1–32.
29. Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características de los residuos peligrosos y el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente. Ley Pub. (Junio, 23, 2006).
30. Norma Oficial Mexicana NOM-063-ZOO-1999, Especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales domésticos. Ley Pub. (Abril, 16, 2006).
31. Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria. Ley Pub. (Febrero, 14, 1996).
32. Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria. Ley Pub. (Marzo, 28, 1994)
33. Reglamento de Insumos para la Salud. Título Séptimo. Terceros Autorizados. Capítulo Único. (Abril, 2, 1998).
34. <http://www.cofepris.gob.mx/>
35. NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Ley Pub. (Julio, 24, 2006)
36. Gauthier C, Griffin G Using animals in research, testing and teaching *Rev. sci. tech. int. Epiz.*,2005: 24 (2) 735-745
37. Code Federal Regulations: Good Laboratory Practice for Non clinical Laboratory Studies. Title 21; Part 58, Washington, D.C., Office of Federal Register. 1996.
38. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. Ley Pub. (Noviembre, 24, 1995).