

**VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DE ESTERILIDAD POR LA TÉCNICA
DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA Y ENDOTOXINAS BACTERIANAS
POR EL MÉTODO DE LAL EN 3 PRODUCTOS FARMACEUTICOS**

**NATALIA CARO CORTES
YEHIMY CRUZ MÉNDEZ**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

**BOGOTÁ D.C.
JUNIO, 2006**

**VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DE ESTERILIDAD POR LA TÉCNICA
DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA Y ENDOTOXINAS BACTERIANAS
POR EL MÉTODO DE LAL EN 3 PRODUCTOS FARMACEUTICOS**

NATALIA CARO CORTES

YEHIMY CRUZ MÉNDEZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar titulo de

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
JUNIO, 2006**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DE ESTERILIDAD POR LA TÉCNICA
DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA Y ENDOTOXINAS BACTERIANAS
POR EL MÉTODO DE LAL EN 3 PRODUCTOS FARMACEUTICOS**

NATALIA CARO CORTES

YEHIMY CRUZ MÉNDEZ

APROBADO

Dra DIANA CRISTINA NEIRA
Bacterióloga
Directora

Dra JANETH ARIAS
Bacterióloga m.s.c
Codirectora

Dr JOSE MANUEL GRANADOS
Médico veterinario
Jurado

Dra ANGELICA RODRIGUEZ
Química farmacéutica
Jurado

**VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DE ESTERILIDAD POR LA TÉCNICA
DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA Y ENDOTOXINAS BACTERIANAS
POR EL MÉTODO DE LAL EN 3 PRODUCTOS FARMACEUTICOS**

NATALIA CARO CORTES

YEHIMY CRUZ MÉNDEZ

APROBADO

Dra ANGELA UMAÑA MUÑOZ
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Dr DAVID GÓMEZ
Director Carrera Microbiología
Facultad de Ciencias

AGRADECIMIENTOS

A la empresa VECOL S.A por brindarnos su apoyo incondicional para nuestro crecimiento profesional y desarrollo personal además de su valiosa colaboración.

A la Dra Janeth Arias Docente de la Pontificia Universidad Javeriana, por su apoyo incondicional y confianza, quien con sus enseñanzas nos otorgo bases para nuestro desarrollo profesional y personal.

A la Dra Diana Neira profesional de la empresa VECOL S.A. por su apoyo, compromiso y orientación que nos llevo a concluir exitosamente con este proyecto.

A todas las personas que durante la carrera contribuyeron con sus enseñanzas y consejos en nuestra vida profesional u personal.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. VALIDACIÓN	2
2.1.1. Características para la validación	2
2.1.2. Clasificación del método analítico	4
2.2. ESTERILIDAD	4
2.2.1. Crecimiento microbiano	6
2.2.2. Medios de cultivo	7
2.2.3. Esterilidad del medio de cultivo	8
2.2.4. Promoción de crecimiento	8
2.2.5. Validación de bacteriostasis y fungistasis	8
2.2.6. Técnicas para la prueba de esterilidad	10
2.2.6.1. Inoculación directa	10
2.2.6.2. Filtración por membrana	10
2.2.7. Diluyentes	12
2.2.8. Ventajas y desventajas	13
2.2.9. Muestreo	14
2.3. PIRÓGENOS	14
2.3.1. Lisado de Amebocito de Limulus (LAL)	16
2.3.1.1. Métodos para el ensayo de LAL	18
2.3.1.2. Interferencias de la técnica de LAL	19
2.3.1.3. Validación de la técnica de LAL	21
2.4. INYECTABLES	24
2.4.1. Calmadex	24
2.4.2. Vitavecol A	25
2.4.2.1. Vitaminas	25
2.4.3. Ivermectina	26
2.4.3.1. Ivermectinas	27

2.4.4. Boldenona	27
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 GENERAL	30
4.2 ESPECÍFICOS	30
5. METODOLOGÍA	32
5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	32
5.1.1. Muestra	32
5.1.2. Número de réplicas	32
5.1.2.1. Prueba de Bacteriostasis y Fungistasis	32
5.1.2.2. Ensayo del rótulo del reactivo de LAL y del operario analista:	32
5.1.2.3. Ensayo Preliminar SPIKE & UNSPIKE:	32
5.1.2.4. Ensayo del rótulo del producto	32
5.1.2.5. Ensayo de rutina	32
5.1.3. Análisis estadístico	33
5.1.3.1. Ejemplo	33
5.1.3.1.1. Caracterización del producto	33
5.1.3.1.2. Ensayo preliminar SPIKE & UNSPIKE	34
5.1.3.1.3. Ensayo del rótulo del producto	35
5.1.4. Variables	36
5.1.4.1 Variables dependientes	36
5.1.4.2. Variables independientes	37
5.2. VALIDACIÓN DE PRUEBA DE ESTERILIDAD	38
5.3 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA LAL	41
6. RESULTADOS	48
6.1. ESTERILIDAD	48
6.2. RESULTADOS LAL	53
6.2.1. Boldenona	53
6.2.1.1. Resultado ensayo de rotulo y validación del Operario	53

6.2.1.2. Caracterización del producto	54
6.2.1.3. Resultados de ensayos preliminares SPIKE & UNSPIKE	54
6.2.1.4. Ensayo de validez del producto	54
6.2.1.4.1. Producto: Boldenona Lote BDN-014	54
6.2.1.4.2. Producto: Boldenona Lote BDN-017	55
6.2.1.4.3. Producto: Boldenona Lote BDN-018	55
6.2.2. Vitavecol A	56
6.2.2.1. Resultado ensayo de rótulo	56
6.2.2.2. Caracterización del producto	57
6.2.2.3. Resultados de ensayos preliminares SPIKE & UNSPIKE	57
6.2.2.4. Ensayo de validez del producto	57
6.2.2.4.1. Producto: Vitavecol A Lote BDN-014	57
6.2.2.4.2. Producto: Vitavecol A Lote BDN-0117	58
6.2.2.4.3. Producto: Vitavecol A Lote BDN-018	58
6.2.3. Calmadex	59
6.2.3.1. Resultado ensayo de rótulo	59
6.2.3.2. Caracterización del producto	60
6.2.3.3. Resultados de ensayos preliminares SPIKE & UNSPIKE	60
6.2.3.4. Ensayo de validez del producto	60
6.2.3.4.1. Producto: Calmadex Lote CMD-405	60
6.2.3.4.2. Producto: Calmadex Lote CMD-406	61
6.2.3.4.3. Producto: Calmadex Lote CMD-408	61
7. DISCUSIÓN	63
8. CONCLUSIONES	69
9. RECOMENDACIONES	71
10. REFERENCIAS	72
11. ANEXOS	75

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Pag
• Tabla 1 Datos requeridos para la validación de los análisis.	5
• Tabla 2 Microorganismos utilizados para las pruebas de promoción de crecimiento y validación de Bacteriostasis y Fungistasis	9
• Tabla 3 Volúmenes Requeridos para la Prueba de esterilidad por Inoculación Directa	11
• Tabla 4 Número de muestras necesarias para la prueba de esterilidad	15
• Tabla 5 Ensayo preliminar Unspike	34
• Tabla 6 Ensayo preliminar Spike	35
• Tabla 7 Resultados de ensayos preliminares	35
• Tabla 8 Procedimiento para ensayo del Rótulo	36
• Tabla 9 Resultado del Ensayo del Rótulo	36
• Tabla 10 Resultados Pruebas de Bacteriostasis y fungistasis <i>A. níger</i> y <i>C. sporogenes</i>	51
• Tabla 11 Resultados Pruebas de Bacteriostasis y fungistasis <i>B. subtilis</i> y <i>C. albicans</i>	51
• Tabla 12 Pruebas de Bacteriostasis y fungistasis <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i>	52
• Tabla 13 Resultado del ensayo del rótulo	53
• Tabla 14 Resultado del Unspike y Spike de la Boldenona	54
• Tabla 15 Resultado de la validación de la Boldenona Lote BDN-014	55
• Tabla 16 Resultado de la validación de la Boldenona Lote BDN-017	55
• Tabla 17 Resultado de la validación de la Boldenona Lote BDN-018	56

• Tabla 18 Resultado del ensayo del rótulo	56
• Tabla 19 Resultado del Unspike y Spike del Vitavecol A	57
• Tabla 20 Resultado de la validación del Vitavecol A Lote VTA-032	58
• Tabla 21 Resultado de la validación del Vitavecol A Lote VTA-033	58
• Tabla 22 Resultado de la validación del Vitavecol A Lote VTA-034	59
• Tabla 23 Resultado del ensayo del rótulo	59
• Tabla 24 Resultado del Unspike y Spike del Calmadex	60
• Tabla 25 Resultado de la validación del Calmadex Lote CMD-405	61
• Tabla 26 Resultado de la validación del Calmadex Lote CMD-406	61
• Tabla 27 Resultado de la validación del Calmadex Lote CMD-408	62
• Tabla 28 Ensayo preliminar Unspike	85
• Tabla 29 Ensayo preliminar Spike	86
• Tabla 30 Procedimiento para el ensayo del Rótulo del producto	88
• Tabla 31 Ensayo de rutina	89
• Figura 1. <i>Limulus polyphemus</i>	16
• Figura 2. Calmadex	25
• Figura 3. Vitavecol A	26
• Figura 4. Ivermectina	27
• Figura 5. Boldenona	28
• Figura 6. Prueba de Esterilidad de medios de cultivo	38
• Figura 7. Prueba de Promoción de crecimiento	39
• Figura 8. Validación de Bacteriostasis y fungistasis	40

• Figura 9. Preparación de la Endotoxina CSE	41
• Figura 10. Ensayo del Rótulo	42
• Figura 11. Validación del rotulo del reactivo LAL y del operario-analista	43
• Figura 12. Caracterización del producto	45
• Figura 13. Ensayo Rótulo del producto	46
• Figura 14. Ensayo de rutina	47
• Figura 15. Crecimiento <i>Bacillus subtilis</i>	49
• Figura 16. Prueba de Bacteriostasis y fungistasis del Calmadex	50

LISTA DE ANEXOS

	Pag
• ANEXO 1 VALIDACIÓN PRUEBA DE ESTERILIDAD	75
• ANEXO 2 PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO	76
• ANEXO 3 VALIDACIÓN DE BACTERIOSTASIS Y FUNGISTASIS	77
• ANEXO 4 PREPARACIÓN DE REACTIVOS	79
• ANEXO 5 VALIDACIÓN DEL ROTULO DEL REACTIVO LAL Y DEL OPERARIO-ANALISTA	81
• ANEXO 6 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO	84
• ANEXO 7 ENSAYO PRELIMINAR SPIKE & UNSPIKE	85
• ANEXO 8 ENSAYO DEL RÓTULO DEL PRODUCTO	87
• ANEXO 9 ENSAYO DE RUTINA	89

RESUMEN

En este estudio, se realizó la validación de las técnicas de esterilidad y endotoxinas bacterianas por los métodos de filtración por membrana y Lisado de Amebocito de *Limulus* (LAL) respectivamente. En la prueba de esterilidad se pudo determinar que tres lavados con el diluyente apropiado son suficientes para inactivar la actividad bacteriostática y fungistática de los productos calmadex, ivermectina y vitavecol A. También se realizaron pruebas de promoción de crecimiento verificando que los medios de cultivo eran óptimos para emplearlos en las pruebas posteriores. Se llevaron a cabo recuentos de los seis microorganismos utilizados para conocer el número de ufc inoculadas y de esta forma darle solidez a la prueba. Por otra parte en la validación de endotoxinas bacterianas se confirmó la sensibilidad del reactivo de LAL utilizado (0.25UE/mL) y la validez de los analistas para poder obtener resultados confiables. Las pruebas preliminares de spike y unspiKe para boldenona, calmadex y vitavecol A demostraron que estos productos no potencian ni inhiben la reacción de LAL; además se escogió la dilución de trabajo con la que se realizó la validación final y con la cual se realizarán las pruebas de rutina.

ABSTRACT

In this study we made the validation of both the sterility and bacterial endotoxins tests through the methods of membrane filtration and Limulus Amebocyte Lysate (LAL). In the test of sterility it was determined that three washings with the appropriate extender are enough to inactivate the bacteriostatic and fungistatic activity of products such as calmadex, ivermectina and vitavecol. Tests of growth promotion were also made to verify that the culture methods were optimal to be used in further tests. Several counts of the six used microorganisms were carried out to find out the number of UFC inoculated and that way to give reliable bases to this test.

On the other side, after validating the bacterial endotoxinas, it was confirmed the sensitivity of the used reagent of LAL (0.25UE/mL) and the validity of the analysts to obtain reliable results. The preliminary tests of spike and unspike for boldenona, calmadex and vitavecol A demonstrated that these products do not harness nor inhibit the LAL reaction. In addition to do the final validation, we chose a work dilution with which further routine tests will be made.

1. INTRODUCCIÓN

En la industria farmacéutica los productos parenterales se diferencian de los demás por su alto grado de pureza y por estar libres de contaminantes físicos, químicos y biológicos, ya que la presencia de cualquiera de estos puede afectar no solo la vida útil del fármaco sino también la salud del paciente.

Son de gran importancia las pruebas que se realizan al producto final, ya que garantizan su calidad, asegurando que esté se está elaborando en condiciones adecuadas que facilitan su comercialización. En el presente proyecto se ejecutaron dos pruebas de tipo biológico: esterilidad, la cual busca determinar contaminantes microbianos como bacterias, hongos y levaduras; y la prueba de endotoxinas bacterianas, que detecta pirógenos endotóxicos de bacterias Gram negativas; estos agentes microbianos juegan un papel fundamental ya que pueden ser adquiridos por el producto en cualquier fase de su producción alterando la calidad del fármaco final.

Debido a la importancia de estas pruebas en la industria farmacéutica nuestro proyecto se fundamentó en la validación de las mismas, ya que un proceso validado además de cumplir con las reglamentaciones gubernamentales, asegura que el proceso evidencie un alto grado de confiabilidad de que funcionara adecuadamente y de manera permanente.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 VALIDACIÓN

Validar es demostrar con un alto grado de confianza, por medio de una evidencia documentada que un proceso específico producirá de forma consistente y permanente productos que poseerán las características de calidad predefinidas. (WHO Technical Report Series, No. 823,1992)

La Validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previas. (USP, 29. 2006.)

La validación de métodos analíticos consiste en la obtención de pruebas documentadas que demuestran que un método analítico es lo suficientemente confiable para producir un resultado previsto dentro de intervalos definidos.

2.1.1 Características analíticas para la validación

- **Exactitud:** La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo.
- **Precisión:** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el método repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones.
- **Especificidad:** Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia

previsible como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

- **Límite de detección:** El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima del analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas.
- **Límite de cuantificación:** El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo: impurezas de fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con una precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas.
- **Linealidad e intervalo:** La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. El intervalo de un método analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior de analito (incluyendo esos niveles) en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad usando el método según se describe por escrito.
- **Reproducibilidad (Tolerancia también conocida como fortaleza o resistencia):** Es el grado de reproducibilidad de los resultados de las pruebas obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras en diversas condiciones, como por ejemplo en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, instrumento, lotes de reactivos, tiempo transcurrido durante la valoración, temperaturas de valoración o días.
- **Robustez:** La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad para no resultar afectado por pequeñas pero

deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal. (USP, 29. 2006)

2.1.2 Clasificación del método analítico

Los procedimientos de las determinaciones farmacopeicas varían desde valoraciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones de atributos subjetivos. Considerando esta amplia variedad de determinaciones, es lógico que diferentes métodos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. (USP, 29 .2006)

- **Categoría I:** Métodos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- **Categoría II:** Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos y pruebas de límite.
- **Categoría III:** Métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco).
- **Categoría IV:** Pruebas de identificación.(Tabla 1)

2.2 ESTERILIDAD

La esterilidad es la característica más importante y esencial de un producto parenteral, la cual puede definirse como la ausencia de todo microorganismo capaz de multiplicarse, un producto estéril debe estar absolutamente libre de organismos viables (OMS, 1998). La prueba de

esterilidad busca determinar contaminaciones microbianas, para asegurar que su uso en humanos o animales no va a desencadenar ningún proceso infeccioso. Por otra parte, es un análisis microbiológico que hace parte del control de calidad en manufactura y sirve para demostrar que el producto es estéril, determinando la ausencia o presencia de microorganismos contaminantes en este. (Arias, 2005)

Tabla 1. Datos requeridos para la validación de los análisis

Característica	Ensayo Categoría I	Ensayo Categoría II		Ensayo Categoría III	Ensayo Categoría IV
		Cuantitativo	Prueba de Límite		
Exactitud	+	+	*	*	-
Precisión	+	+	-	+	-
Especificidad	+	+	+	*	+
Límite de Detección	-	-	+	*	-
Límite de Cuantificación	-	+	-	*	-
Linealidad	+	+	-	*	-
Rango	+	+	*	*	-

USP XXIV. The United States Pharmacopeia Convention, Inc. Validación de métodos analíticos. Capítulo 12. Pág. 2622-2625

Puede requerirse dependiendo de la naturaleza de la prueba.

La administración parenteral comenzó en 1900, desde ese momento se empezaron a formular los primeros requerimientos de esterilidad y hasta 1932 apareció el primer compendio oficial de la farmacopea Británica. Luego en 1936 en la USP (UNITED STATES PHARMACOPOEIA) fueron publicadas las pruebas de esterilidad junto con las demás entidades BP (BRITISH PHARMACOPOEIA), OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD) y código de regulación federales. (Arias 2005)

El fundamento de la prueba de esterilidad consiste en establecer un procedimiento para valorar la ausencia / presencia de microorganismos aerobios y/o anaerobios facultativos viables (bacterias, hongos y levaduras) en cada producto final.

Para realizar la prueba de esterilidad se necesita utilizar más de un medio de cultivo. En muchos países y según la normatividad internacional, se emplea medio líquido de tioglicolato y el medio hidrolizado de soya y caseína, pero también puede utilizar cualquier otro medio que haya demostrado poseer propiedades nutritivas que sean al menos equivalentes.

Para verificar las propiedades nutritivas de cada medio de cultivo se utilizan cepas de microorganismos muy exigentes desde el punto de vista de las necesidades nutritivas y de las condiciones de aerobiosis – anaerobiosis. El inóculo debe constar de un reducido número de microorganismos que oscilan entre 10 UFC y 100 UFC. (Arias, 2005)

La prueba de esterilidad debe realizarse en condiciones estrictas, destinadas específicamente a evitar la contaminación microbiana del material que se ensaya, utilizando cabinas de seguridad biológica como las de flujo laminar siguiendo todas las normas requeridas por las BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio).

Dentro de los parámetros para realizar la prueba de esterilidad, se debe tener en cuenta:

2.2.1 Crecimiento Microbiano:

Para el crecimiento de los microorganismos estos deben tomar del ambiente todas las sustancias que requieren para la síntesis de sus materiales celulares y para la generación de energía, los medios de enriquecimiento líquidos (Tioglicolato de sodio y Trypticase Soya)

seleccionan los microorganismos de más elevada tasa de crecimiento, el resultado del enriquecimiento en un medio determinado puede ser modificado por la variación de otros factores como la temperatura, el pH, la iluminación, aireación o fuente de inóculo. Es por ello, que las poblaciones microbianas mantiene un crecimiento exponencial.

2.2.2 Medios de Cultivo:

La USP y BP describen dos medios de cultivo para ser usados en la prueba de esterilidad de productos parenterales:

MEDIO FLUIDO DE TIOGLICOLATO

El Medio Fluido de Tioglicolato (FIM) es un excelente medio para la detección de contaminación bacteriana, provee ambiente de aerobiosis y anaerobiosis.

Las sustancias reductoras, tioglicolato y caseína, proporcionan una anaerobiosis suficiente, incluso para anaerobios exigentes. Debido a sus grupos sulfhídricos, se inactivan los componentes arsénico, mercurio y otros metales pesados, la elevada viscosidad del medio impide la penetración rápida de oxígeno. El eventual aumento de oxígeno se pone en manifiesto por un viraje a rojo del indicador de redox de resarzurina sódica. El color rosa debe ocupar no más de la tercera parte del volumen del medio. (Akers, 2003)

MEDIO TRIPTICASA DE SOYA

El medio Tripticasa de Soya (TSB), es un medio versátil y altamente nutritivo que se recomienda para el crecimiento de hongos y levaduras, reemplazando al agar Sabouraud. Además es un medio de cultivo universal, el cual esta exento de sustancias inhibitorias y de indicadores.

Es útil en las pruebas de esterilidad para recuperación de mohos y levaduras contaminantes. (USP 29, 2006).

Es importante tener en cuenta, que si los medios son preparados y no son utilizados dentro de los siguientes días, se pueden almacenar a temperatura +/- 25 C, y en recipientes sellados. Es importante realizar la prueba de promoción de crecimiento para corroborar la efectividad del medio.

2.2.3. Esterilidad del medio de cultivo:

La esterilidad de un medio de cultivo se confirma incubando una parte del lote de medio esterilizado a una temperatura de incubación específica, durante 14 días, estos medios sirven como controles negativos durante la realización de la prueba de esterilidad.

2.2.4 Promoción de Crecimiento:

Los medios preparados de Tioglicolato de Sodio y Trypticase de Soya, deben someterse a una prueba de promoción de crecimiento, donde se evidencia la capacidad del medio de cumplir con todas las exigencias nutricionales que pueda demandar el desarrollo de los microorganismos. Cada lote de medio deshidratado o cada lote de medio preparado de ingredientes básicos debe ser analizado por esta prueba, para comprobar que tiene los nutrientes necesarios para promover el crecimiento de microorganismos presentes en el producto. Cada medio debe ser inoculado, por duplicado con una cantidad entre 10 a 100 microorganismos viables por mililitro e incubados a las condiciones específicas. (Tabla2).

La prueba del medio es satisfactoria si visualmente se evidencia la aparición de crecimiento microbiano en todos los medios inoculados durante 7 días de incubación.

La prueba de esterilidad no es válida si la esterilidad del medio o la prueba de promoción de crecimiento no son satisfactorias. (Arias, 2005)

2.2.5 Validación para Bacteriostasis y Fungistasis:

Si una prueba de esterilidad es negativa, se debe asegurar que el crecimiento microbiano no es inhibido por las propiedades antimicrobianas del producto. La USP provee un procedimiento para determinar el nivel de actividad bacteriostática y fungistática de un producto o material antes de realizar la prueba de esterilidad. Básicamente el procedimiento se realiza filtrando el producto y lavándolo con un contenido entre 10 y 100 microorganismos, comparándolo con el control positivo que no contiene el producto. Si el material procesado tiene actividad antimicrobiana, el medio demostrará la disminución o ausencia de crecimiento microbiano comparado con el control positivo.

Tabla 2. Microorganismos utilizados para las pruebas de promoción de crecimiento y validación de Bacteriostasis y Fungistasis:

Medio	Microorganismo	Cepa	Incubación (7 días)	
			Temperatura	Condiciones
Tioglicolato de Sodio	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	32.5°C ± 2.5°C	Aeróbicas
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	32.5°C ± 2.5°C	Aeróbicas
	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 1137	32.5°C ± 2.5°C	Anaeróbicas
Trypticase de Soya	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	22.5°C ± 2.5°C	Aeróbicas
	<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	22.5°C ± 2.5°C	Aeróbicas
	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC16404	22.5°C ± 2.5°C	Aeróbicas

USP XXIV. The United States Pharmacopoeia Convention, Inc. Sterility Test. Capítulo 7. Pág. 1818-1819

Antes de establecer un procedimiento para evaluar la esterilidad de un producto por filtración por membrana, se debe asegurar que la inherente actividad bacteriostática y Fungistática propia del producto, no afecta adversamente la prueba de esterilidad. Se deben preparar diluciones de bacterias y hongos con una concentración final entre 10 y 100 microorganismos viables.

Esta prueba se utiliza en filtración por membrana, para establecer el número de lavados que deben hacerse con el diluyente apropiado o si definitivamente el efecto inhibitorio del producto es fuerte.

En la inoculación directa es útil para conocer la cantidad de medio que debe utilizarse para realizar la prueba.

2.2.6 TÉCNICAS PARA LA PRUEBA DE ESTERILIDAD

2.2.6.1 Inoculación Directa

Técnica de esterilidad en la cual se transfiere directamente una cantidad apropiada de producto, tomado de un recipiente cerrado herméticamente, la cantidad suficiente para trasladar a los medios de cultivo destinados a la detección de bacterias aerobias y anaerobias (Tioglicolato de Sodio), así como a los medios de detección de los hongos y levaduras (Trypticase de Soya).

Es necesario tener una cantidad suficiente del medio de cultivo para tener la seguridad que sus propiedades nutritivas no sean afectadas por la adición del producto en curso del examen. Con objeto de garantizar la distribución homogénea y de eliminar la actividad antibacteriana, a menos que se indique de otro modo la normatividad o en el inserto del producto, se debe transferir el producto en estudio de modo que los líquidos tengan una dilución aproximada de 10 veces y los sólidos de unas 100 veces.

Las pruebas de esterilidad de la USP y BP requieren un volumen mínimo de muestra por volumen contenido de producto para ser transferido a cada medio de cultivo, como se indica en la (Tabla 3).

El volumen de la muestra debe representar suficientemente el contenido del producto, y el volumen del medio deben promover adecuadamente el crecimiento microbiano. (Akers, 2003)

2.2.6.2 Filtración por Membrana

Las farmacopeas USP XXIV, BP 2000 y la OMS, exponen la filtración por membrana como la técnica más recomendable para efectuar Pruebas de Esterilidad.

Para esta prueba es necesario la utilización de filtros de membrana de excelente calidad, de preferencia certificados por el fabricante, que tenga

un tamaño nominal de poro de 0.45µm o 0.22µm, dependiendo del producto a procesar, y con un diámetro aproximado de 47mm-50 mm, los materiales más utilizados en la fabricación de filtros son acetato y nitrato de celulosa.

Se deben emplear discos de filtro con un diámetro aproximado de 50 mm en un dispositivo de filtros previamente esterilizado. Si se utilizan filtros de distinto diámetro, deben ajustarse en consecuencia a los volúmenes de las diluciones y los lavados.

Tabla 3. Volúmenes Requeridos para la Prueba de esterilidad por Inoculación Directa

Presentación del Producto (ml)	Volumen mínimo del producto (ml)	Volumen mínimo del Medio (ml)
10 o menos	1 (o el total del contenido sí es menor a 1)	15
10-50	5	40
50-100	10	80
100-500	Mitad de los los frascos	N/A
>500	500	N/A
Antibióticos líquidos	1	N/A

N/A No aplica

Parenteral Quality Control, Sterility Testing, 2003

Antes de efectuar la prueba, debe filtrarse una pequeña cantidad de diluyente estéril apropiado. Se debe transferir el contenido del recipiente o los recipientes que se han de examinar al equipo. Si es posible, transferir todo el contenido de los recipientes o la cantidad mínima dejada para la prueba por Inoculación Directa. Si es preciso, diluir el producto que se va a ensayar con el diluyente estéril elegido o siguiendo las instrucciones del inserto.

De preferencia transferir una membrana a cada uno de los medios utilizados, o si no es posible, transferir una membrana cortada asépticamente en dos partes iguales a los diferentes medios. Incubar los medios de cultivo (Tioglicolato de Sodio y Tripticasa Soya) durante 14 días a 32.5°C +/- 2.5°C si se trata de detectar principalmente bacterias y a

22.5°C +/- 2.5 C si la prueba esta específicamente destinada a detectar hongos y levaduras.

Si no se evidencia contaminación de los medios, la prueba se reporta como SATISFACTORIA, si al contrario se presenta crecimiento microbiano, se realiza tipificación para determinar el microorganismo contaminante, y se repite nuevamente la prueba, en este caso se reporta como NO SATISFACTORIA.

Resumiendo cinco pasos básicos están involucrados en el método de filtración por membrana:

1. La unidad de filtración debe estar correctamente ensamblada y esterilizada antes de usarse.
2. La muestra es transferida al filtro en estrictas condiciones de asepsia.
3. La muestra es filtrada con ayuda de un sistema de vacío de presión diferencial.
4. La membrana es retirada asépticamente y cortada en la mitad (para cada medio).
5. Las mitades son colocadas en cada medio utilizado (Tioglicolato y Tripticasa). (Akers, 2003)

2.2.7 Diluyentes

Para los lavados de las membranas se utilizan diluyentes denominados, diluyente A, diluyente D y diluyente K; para sustancias miscibles en agua se utiliza el diluyente A, este contiene digerido péptico de tejido animal en una concentración de 1g/L. En caso de los líquidos inmiscibles en agua y que además contienen lecitina o aceite se utiliza el diluyente D, que además del digerido péptico de tejido animal contiene tween 80 en concentración de 1g/L; estas soluciones también son empleadas para disolver y acondicionar la muestra a evaluar e inhibir sustancias bacteriostáticas y fungistáticos que pueda contener la muestra. (USP XXIX, 2006).

El diluyente también es usado para disolver un producto estéril sólido antes de la filtración. Los diluyentes minimizan la destrucción de pequeñas poblaciones de células vegetativas durante la solubilización y filtración de productos farmacéuticos estériles. (Akers, 2003)

Debido a que contienen concentraciones equilibradas de sustancias nutritivas que impiden el shock fisiológico de los gérmenes retenidos por la filtración y por lo tanto, hace posible un rápido crecimiento de los mismos. (Merck, 2000).

El tween 80 del diluyente D actúa como detergente, capturando las partículas oleosas y retirándolas de la membrana, respetando cuidadosamente el material microbiano. (Remington, 2000).

2.2.8 Ventajas y Desventajas

El método de filtración por membrana ofrece cinco ventajas sobre el método de inoculación directa:

1. Mayor sensibilidad
2. Los agentes antimicrobianos y otros solutos antimicrobianos en la muestra pueden ser eliminados por los lavados realizados al filtro, de esta forma minimiza la incidencia de resultados con falsos-negativos.
3. El contenido total de los productos puede ser evaluado, dando una ventaja en las pruebas realizadas a productos de gran volumen, incrementando la capacidad de detectar contaminantes.
4. Bajos niveles de contaminación pueden concentrarse en la membrana, por filtración de un alto volumen del producto.
5. Los organismos presentes en un producto oleoso pueden separarse del producto en la filtración y adaptarse mejor en medios acuosos como lo son el tioglicolato y el tripticasa.

Contrariamente, el método de filtración por membrana tiene dos principales desventajas comparado con el de inoculación directa:

1. Existe una alta probabilidad de contaminación debido a las operaciones manuales como lo son el ensamblaje del equipo de filtración, el corte de la membrana, y su posterior transferencia a los medios.
2. En el método de filtración es más difícil diferenciar la fuente de contaminación, que puede ser la filtración, la membrana o el medio de cultivo.(Akers, 2003)

Estas dos desventajas desaparecen con los equipos de filtración por membrana que son completamente cerrados.

2.2.9 Muestreo

Las muestras de envases y productos definitivos de cada lote final que van a ensayar se toman de forma representativa. Cuando la prueba de esterilidad es realizada en lotes cuyo número no es estadísticamente representativo, los resultados no pueden ser extrapolados con seguridad para garantizar las condiciones de esterilidad del lote.

Siempre que los lotes finales sean de 500 o más envases, no se tomarán menos de 10 envases, excepto en el caso de los lotes de menos de 100 envases en los que solo será necesario ensayar el 10%.

Para calcular el número de muestras se ha propuesto la fórmula de **0.4 N** en la que N representa el número de recipientes o envases definitivos de que consta el lote. (Tabla 4)(Arias, 2005)

2.3 PIRÓGENOS

La detección de pirógenos, cobra importancia cuando se habla de Control de Calidad en productos. Varias décadas de experiencia en la detección de pirógenos, sugieren que solamente los pirógenos que están en soluciones parenterales y dispositivos médicos, son derivados de la membrana externa de bacterias Gram Negativas. (Arias, 2005).

Cuando son inyectados en humanos en cantidades suficientes, los pirógenos pueden causar variedad de efectos adversos, el más común es el aumento de la temperatura corporal. Los efectos de los pirógenos raramente causan la muerte, sin embargo los pirógenos son considerados sustancias tóxicas que pueden contaminar soluciones parenterales. (Akers, 2003)

Tabla 4. Número de muestras necesarias para la prueba de esterilidad

Número de Viales del Lote Final (N)	Cantidad de Muestras
<100	5
100-500	10
501-1000	13
1001-5000	28
5001-10000	40
10001-20000	56
>20000	63

Manual de Microbiología Farmacéutica. 2004

Los pirógenos provienen de microorganismos, todas las formas microbianas producen pirógenos, sin embargo, el origen más potente son las bacterias gram negativas. La estructura primaria involucrada en las reacciones pirogénicas en mamíferos es el lipopolisacárido (LPS), de la membrana celular de bacterias gram negativas, conocido también como endotoxina. (Akers, 2003).

El LPS extraído y recuperado como una suspensión coloidal, puede dividirse por una hidrólisis ácida suave a lípido A y polisacáridos. El lípido A es un compuesto de β -1,6 glucosamina, disacáridos unidos con ácido hidroximiriístico. Cada dos unidades de glucosamina separadas por dos fosfatos forman un polímero lineal. El lípido A por si solo pierde actividad biológica, probablemente porque el polisacárido incrementa la solubilidad acuosa del lípido A; se ha demostrado que cuando el lípido A es separado del polisacárido componente de la endotoxina, este pierde mas de 99.9% de su actividad pirogénica en conejos

La ausencia de contaminación por pirógenos, caracteriza a los productos parenterales de la misma manera que los son parámetros como la esterilidad y material particulado. La prevención de contaminación de estos agentes, involucra principalmente el uso de ingredientes, solventes, materiales de empaque y equipo de procesamiento que haya sido anteriormente despirogenado, y un apropiado proceso de manufactura para minimizar la posibilidad de desarrollo de pirógenos. (Akers, 2003)

Los métodos escogidos para la detección de pirógenos bacterianos más utilizados son: la prueba de pirógenos en conejos USP-BP y la prueba del extracto del *Limulus Amebocito Lisado-LAL*.

2.3.1 Lisado de Amebocito de Limulus (LAL)

Fue desarrollada en 1964 cuando se reportaron que las preparaciones de endotoxina termoestable de *Escherichia coli* y *Vibrio polyphemus*, inducían la coagulación extracelular de la hemolinfa de *Limulus polyphemus* (Figura 1), conocido como cangrejo de herradura. Estudios realizados han permitido determinar que los amebocitos, las células constituyentes de la hemolinfa del cangrejo eran requeridas para la coagulación.

Esta prueba puede reemplazar la prueba de pirógenos, para el control de producto terminado de drogas inyectables para uso animal y dispositivos médicos. Se recomienda la prueba de LAL para la cuantificación de endotoxinas en materia prima empleada en la producción incluyendo agua y para controlar los niveles de endotoxina durante el proceso de producción.



Figura 1 *Limulus polyphemus*

El principio biológico de esta prueba se basa en la reacción que lleva a cabo la formación del coágulo a través de una cascada de pasos de activación enzimática. La proteína de coagulación (coagulógeno) es desdoblada por la enzima de coagulación activada; los productos del desdoblamiento son insolubles y se unen mediante interacción iónica para formar la matriz del gel.

La sensibilidad en la prueba de LAL es definida como la baja concentración de la endotoxina purificada que puede producir un gel firme, el cual puede permanecer intacto cuando es invertido 180° por el método de gel clot, después de una hora de incubación a 37°C (Arias, 2005).

El mecanismo de acción comprende los siguientes pasos:

1. La endotoxina o un preparado de lípido A derivado de la endotoxina, activa una proenzima de LAL (lisado de amebocito de *Limulus*), con un peso molecular de 150.000.
2. La activación también depende de la presencia de cationes metálicos divalentes como el calcio, manganeso o magnesio. Se ha demostrado que la sensibilidad del ensayo de LAL incrementa de 10 a 30 veces si se usa un reactivo de LAL que contenga 50mM de magnesio.
3. La proenzima activada relacionada a una clase de proteasas tales como trombina, tripsina y factor Xa, subsecuentemente reaccionan con una fracción de proteína de bajo peso molecular, contenida también en el LAL.
4. La fracción de bajo peso molecular, llamada coagulógeno, es escindido por la proenzima en subunidades solubles e insolubles. La subunidad insoluble aparece como un coágulo sólido, un precipitado o una solución turbia, dependiendo de la cantidad de coagulógeno insoluble formado por el producto (Akers, 2003).

La prueba de LAL ofrece siete ventajas sobre la prueba biológica en conejos para la detección de pirógenos en productos inyectables parenterales:

- a. Mayor sensibilidad.
- b. Más puntual.
- c. Mejor especificidad.
- d. Menor variación.
- e. Más rápida.
- f. Obtención de resultados cuantitativos.
- g. Menos costosa.

2.3.1.1 Métodos para el ensayo de LAL

Para la realización de la técnica de LAL existen tres métodos:

1. Método turbidimétrico:

El reactivo turbidimétrico contiene suficiente coagulígeno para formar una solución turbia pero no un coágulo firme, cuando es dividido en subunidades por la enzima procuagulante y el punto final se determina por lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 360nm. (Prior, 1990)

2. Método cromogénico:

Es un método cuantitativo en el cual el coagulígeno se reemplaza total o parcialmente por un sustrato cromogénico el cual es un péptido sintético pequeño unido covalentemente a un cromóforo (p-nitroanillida). La intensidad del color formado (amarillo que absorbe a una longitud de onda de 405nm), es proporcional a la cantidad de endotoxina y se determina por interpretación en una curva patrón. (Prior, 1990)

3. Método de gelificación:

Es un método semicuantitativo, puesto que el punto final del ensayo se halla entre la mayor dilución de la muestra que presenta un gel firme y la dilución inmediatamente anterior.

Esencialmente la prueba consiste en la adición de 0.1 ml de lisado y 0.1 ml de producto a evaluar en tubos despirogenizados, que se ponen al baño de maría a 37°C y luego se invierte el tubo cuidadosamente 180°. Si la solución ha formado un gel y permanece en el fondo del tubo, la prueba es positiva, de lo contrario si la solución permanece líquida la prueba es negativa. (Prior, 1990)

2.3.1.2 Interferencias de la técnica de LAL

La reacción del reactivo de LAL se ve interferida frecuentemente por la muestra que está siendo ensayada y puede ser causada por diferentes factores, existen tres tipos de interferencias:

1. Inhibición:

Es el tipo de interferencia más común y se reconoce por una disminución en la sensibilidad de LAL. Todo producto debe ser ensayado previamente para verificar la ausencia de inhibición ya que esta puede llevar a resultados falsos positivos. (Cooper, 1999).

Factores de inhibición

- **pH:** el reactivo de LAL tiene una capacidad limitada de tamponación. El pH crítico es el de la mezcla de muestra con el reactivo.
- **Cationes divalentes:** neutralizan la carga negativa de las endotoxinas e incrementan la agregación disminuyendo actividad / potencia. Son requeridos para la sensibilidad óptima de LAL, además la sal reactiva puede inhibir la reacción
- **Excipientes:** algunos excipientes pueden causar interferencia con la prueba dando como resultado la inhibición.
- **Agentes quelantes:** Tales como el EDTA, Heparina, enlazan cationes divalentes.

- Material de vidrio: Los tubos con resto de NaOH, causan una interferencia y como resultado una inhibición en la formación del gel.
- Falsos positivos: Solo se puede comprobar que un resultado positivo es falso, en la ausencia de la endotoxina. Si los resultados indican un incremento repentino sin explicación, se debe buscar contaminación de endotoxina en primer lugar, y luego realizar cambios de formulación en el producto o proceso.

2. Potenciación:

Es un incremento en la sensibilidad del reactivo LAL, por lo tanto detecta más endotoxinas de las presentes en la muestra. Es fácil confundir la potenciación con la presencia de endotoxinas en la muestra. Una forma de conocerla es colocando una cantidad de CSE concentración de endotoxina estándar a muestra libre de endotoxinas y determinando con el ensayo de LAL la cantidad de endotoxinas presentes. Si la cuantificación de endotoxinas resulta mayor que la cantidad conocida adicionada, se habla el fenómeno de potenciación.(Cooper, 1999)

3. Falsos positivos:

Estos resultados se obtienen por la presencia de sustancias que activan el LAL, diferentes a las endotoxinas, ellos sugieren que las endotoxinas están presentes cuando en realidad no es así. Para reconocer un falso positivo, debe conocerse la naturaleza del producto y el proceso de fabricación. Aunque estos casos son muy raros se sabe que sustancias como la tripsina y glicanos son causantes de resultados falsos positivos.(Werner, 1998)

2.3.1.3 Validación de la técnica de LAL

- Estándares de endotoxina para la prueba LAL:

Debido a las diferentes variables que se presentan con la endotoxina, tales como variación de potencia, la USP y la FDA produjeron una preparación de endotoxina o patrón primario de *E-coli* llamado endotoxina

estándar de referencia (RSE) de potencia conocida, la cual sirve como estándar para calibrar la potencia de un control de endotoxina estándar (CSE) o patrón secundario. La potencia de la RSE esta dada en unidades de endotoxina UE por vial y la potencia del patrón secundario esta dado en unidades de UE/ng. (Associates of Cape code, inc.1997) Ver anexo 4

- Validación del operario:

Esta validación se recomienda para el operario o analista que va a comenzar a trabajar o a realizar un análisis con el reactivo de LAL, para de esta forma obtener resultados confiables en la prueba.

Se prepara una serie de diluciones del CSE para obtener concentraciones de 2λ , 1λ , 0.5λ , 0.25λ , donde (λ) es la sensibilidad marcada del reactivo de LAL dada en unidades de endotoxina por mililitro UE/ml. Se realiza la validación con concentraciones del CSE cuatro veces por dilución. La USP y FDA establecieron que la desviación estándar para las cuatro réplicas, para un límite superior del 99%, es de 0.365, los resultados hallados que sean inferiores a este límite de confianza estadístico, permiten considerar que la variabilidad esta bajo control. (Agudelo, 1999)

Por último se determina el promedio geométrico que da la concentración del punto final de la sensibilidad, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{MG} = \text{Antilog } X$$

Donde x es igual a la suma de las concentraciones de punto final, dividido por el número de réplicas realizadas.

El valor de sensibilidad debe estar en el rango de $2/\lambda$ y 2λ , puesto que el error del método es +/- una dilución. (Agudelo, 1999).

El punto final es la última dilución de la serie que da resultado positivo es decir, donde se forma el gel firme. Ver anexo 5

- Validación de la sensibilidad del rótulo:

Mediante este ensayo se verifica que la cantidad de endotoxina señalada en el rótulo es la detectada por el reactivo de LAL, debe realizarse cada vez que se trabaja con un nuevo lote de LAL, para comprobar que no hay variación en la sensibilidad del rótulo del reactivo.

Esta determinación se logra preparando una serie de diluciones de la CSE por cuádruplicado con concentraciones de 2λ , 1λ , 0.5λ , 0.25λ , donde (λ) es la sensibilidad marcada del reactivo de LAL dada en unidades de endotoxina por mililitro UE/ml, a las que se le agrega reactivo de LAL, se llevan a incubación y se leen.

Se determina la concentración estándar y el promedio geométrico, el cual nos dará el grado de variabilidad y la concentración del punto final de la sensibilidad el cual debe estar en el rango de 0.5λ y 2λ . (Agudelo, 1999) (Ver anexo 5)

- Límites de endotoxina:

El límite de endotoxina hace referencia a la máxima cantidad de endotoxina que puede ser administrada por hora a un paciente sin provocar una respuesta pirogénica, que es de 5 UE/Kg de peso, tomando como peso promedio un adulto de 70 Kg obteniendo una dosis de administración total de 350 UE por hora. El límite de endotoxina es definido como K/M que es igual a la cantidad de endotoxina por ng o ml del producto, donde K es igual a 5 UE/Kg de peso corporal y M es igual a la máxima dosis recomendada por Kg de peso que puede ser administrada en una hora.

- Máxima dilución válida:

Es la mayor dilución que se le puede hacer al producto y aún detectar el límite de endotoxina con el método LAL, por lo general los productos son validados en diferentes diluciones inferiores a la máxima dilución válida (MDV).

Para realizar los cálculos de MDV se hace referencia al límite de endotoxina permitido por USP del producto a evaluar, se revisa la

presentación del producto y referencia el límite de sensibilidad de LAL de trabajo, para aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Máxima dilución válida (MDV)} = \frac{\text{Límite de endotoxina UE/ml}}{\text{Sensibilidad de LAL}}$$

Si no se encuentra referenciado el límite de endotoxina en la USP para el producto a analizar se aplica la siguiente fórmula: **K/M** (USP XXIX. 2006)

- Validación del producto:

- a. Ensayos preliminares:

El objetivo de esta prueba es determinar que la concentración del producto que se está ensayando, no interfiere de una forma significativa con la prueba. Estos procedimientos consisten en ensayos que incluyen una serie de diluciones del producto con y sin endotoxinas agregadas, el producto puede ser diluido para eliminar la interferencia y detectar concentraciones críticas de endotoxina. (Associates of Cape code, inc.1997)

En este ensayo se realizan una serie de diluciones por cuadruplicado del producto sin exceder la MDV. Una serie de tubos se ensaya con la adición de la endotoxina (**Spike**) a una concentración de 2λ y en la otra serie no se adiciona endotoxina (**Unspike**).

En los tubos que contienen endotoxinas (spike) se debe presentar formación de gel, si no se presenta significa que hay inhibición por parte del producto; en los productos que no tienen endotoxinas, no debe haber formación de gel. En esta prueba se determina la dilución de trabajo del producto, requerida para superar interferencias, la dilución elegida debe ser al menos el doble después de la primera dilución en la cual no existe evidencia de inhibición. (Ver anexo 6 y 7)

- Ensayo de validación del producto final:

Con este ensayo se evalúa la concentración de endotoxinas bacterianas en el producto terminado, se realiza con base en los resultados obtenidos

en los ensayos preliminares, en la dilución de trabajo estandarizada en estos ensayos.

La dilución de trabajo se expone a diferentes concentraciones de endotoxina CSE (1.0, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.06 UE/ml), las cuales se comparan con la CSE en agua (validación del rótulo del reactivo de LAL). Se debe presentar formación de gel en las concentraciones mayores o iguales a la sensibilidad rotulada del reactivo de LAL.

Se debe obtener un resultado que no difiera por más de un factor de dos de la sensibilidad etiquetada del reactivo entre 0.5λ y 2λ . (Ver anexo 8)

2.4 INYECTABLES

Se entiende por inyectables las soluciones o suspensiones estériles en un vehículo acuoso (a veces aceite). Los inyectables deben estar libres de partículas de sustancias extrañas y de pirógenos. Pueden suministrarse en ampollas, viales multidosis o frascos de gran volumen con un tapón de goma o bolsas IV, que se puedan conectar para una infusión intravenosa. (Adams, 2001)

2.4.1 Calmadex:

Solución acuosa estéril de uso parenteral, que contiene Calcio, Fósforo, Magnesio y Dextrosa. Calcificante y reconstituyente. Para el tratamiento de las deficiencias de Calcio, Fósforo, Magnesio y Glucosa, en bovinos, equinos, porcinos, ovinos y caprinos. En caso de fiebre de leche, eclampsia puerperal y como adyuvante en el tratamiento de la cetosis bovina, raquitismo, síndrome de la vaca caída e hipoglicemia. Dosis: 120 ml por cada 100 Kg de peso vivo; vía intravenosa ó intraperitoneal. (Vademécum, 2005)

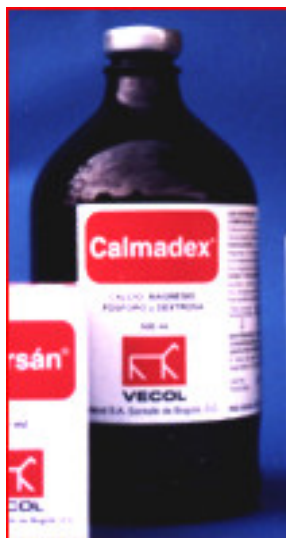


Figura 2 Calmadex

2.4.2 Vitavecol A:

Solución oleosa estéril de uso parenteral y oral que contiene Vitamina A y Alfa Tocoferol acetato (Vitamina E) disuelta en aceite mineral. Se utiliza para subsanar deficiencias de las vitaminas A y E en bovinos, equinos y porcinos. Coadyuva en el mantenimiento normal, la estructura, el funcionamiento normal y la regeneración de las células epiteliales de la piel y de las mucosas de los aparatos digestivo, respiratorio y ocular. Previene los problemas reproductivos como son la esterilidad, el aborto, y el nacimiento de crías débiles y ciegas. También es de gran utilidad en la recuperación de animales convalecientes que han sufrido enfermedades debilitantes y parasitarias. Dosis: 1 ml de la solución por cada 60 Kg de peso vivo, aplicados vía intramuscular profunda, subcutánea o por vía oral. (Vademécum, 2005)

2.4.2.1 Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos imprescindibles para el crecimiento y mantenimiento del organismo; actúan como reguladores metabólicos. (Sumano, 2001)



Figura 3 Vitavecol A

- VITAMINA A

La vitamina A existe en diferentes formas, y el término se usa con frecuencia para representar los diversos compuestos. El retinol (Vitamina A₁), un alcohol primario esta presente en forma esterificada en los tejidos de animales y peces de agua salada, principalmente en el hígado. (Goodman y Gilman, 1981)

Un compuesto estrechamente relacionado, el 3-dehidrorretinol (Vitamina A₂), se obtiene de los tejidos de peces de agua dulce, generalmente mezclado con retinol. (Goodman y Gilman, 1981)

2.4.3 Ivermectina 1%:

Solución acuomiscible de uso parenteral que contiene Ivermectina para controlar parásitos internos y externos (nemátodos gastrointestinales y pulmonares; nuches, piojos y ácaros de la sarna). Ayuda en el control de la garrapata *Boophilus microplus* en bovinos, porcinos y otras especies menores. Dosis: En bovinos aplicar 1 ml por cada 50 Kg de peso vivo y en porcinos 1 ml por cada 33 Kg de peso vivo. Vía subcutánea. (Vademécum, 2005.)

2.4.3.1 Ivermectinas

También se denominan avermectinas. Dentro de este grupo, se encuentran los siguientes fármacos: ivermectina, abamectina, doramectina, moxidectina y milbenicina.

Este grupo de medicamentos fue sintetizado en 1980 por Chavala y colaboradores a partir de un fermentado de *Streptomyces avermitilis*, del cual se obtiene un anillo lactona macrocíclicos que muestra efectos como antibiótico, antinematódico y además una marcada toxicidad contra los insectos. (Sumano, 2001)

- Ivermectina

Es el resultado de la fermentación bacteriana del *Streptomyces avermitilis*, obtenido por primera vez por Burg y colaboradores en el año de 1979. Más adelante, se descubrió su potente actividad antihelmíntica. Se inicio su comercialización para medicina veterinaria en 1981. La ivermectina es un análogo semisintético de la abamectina. (Sumano, 2001)



Figura 4 Ivermectina

2.4.4 Boldenona

Solución oleosa estéril de uso parenteral que contiene Boldenona Undecilato disuelta en aceite vegetal. Anabólico para usar en bovinos, equinos, porcinos y caninos. Coadyuvante en los casos que se desea

promover la síntesis proteica, en enfermedades de tipo consuntivo o debilitantes que produzcan pérdida de peso. Dosis: En bovinos, equinos y porcinos aplicar 1.0 ml por cada 90 Kg de peso vivo, en los casos de los bovinos se puede repetir en 20 días. En equinos repetir 10 y 45 días. En animales reproductores la dosis se recomienda aplicarla cada 30 días con un máximo de 3 veces. En caninos la dosis es de 0.25 mL por cada 5 Kg de peso vivo. Se aplica por vía intramuscular profunda. (Vademécum, 2006)



Figura 5 Boldenona

3. JUSTIFICACIÓN

Este proyecto surge de la política de calidad que existe en la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios VECOL S.A de garantizar la eficacia e inocuidad de sus productos asegurando la calidad de los mismos; por esta razón se planteó la necesidad de validar las pruebas de esterilidad y endotoxinas bacterianas que generen productos de administración parenteral con un alto estándar de calidad que puedan ser certificados ante las instituciones gubernamentales.

Para esto se debe cumplir con ciertos modelos como las BPM (Buenas Prácticas de Manufactura), que tienen por objeto disminuir los riesgos inherentes a toda producción farmacéutica que no pueden prevenirse completamente mediante el control final de los productos.

El objetivo de este estudio es demostrar que los resultados de los procedimientos para verificar la esterilidad y límites de endotoxinas en productos parenterales son confiables y veraces en los diferentes tipos de formulaciones en las que el vehículo en cada una de ellas presenta diferentes constantes dieléctricas. Se seleccionaron 3 productos que representan los diferentes tipos de polaridad de fase; Ivermectina 1% producto de polaridad intermedia acuomiscible, Boldenona y vitavecol A productos no polares oleosos y Calmadex producto con fase polar totalmente acuosa.

Con este perfil de solubilidades se puede demostrar el desempeño de la prueba de esterilidad, así como la prueba de LAL. Lo cual permitirá establecer una evidencia documentada, que cualquier producto inyectable fabricado y comercializado en la actualidad por VECOL S.A. suministra un alto grado de seguridad que funcionara de manera permanente y adecuada.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

- Validar las pruebas de esterilidad y endotoxinas bacterianas para tres productos que contienen los principales vehículos de disolución como son Ivermectina 1%, Calmadex, Vitavecol; y Boldenona, Calmadex y Vitavecol respectivamente, por medio de las técnicas de filtración por membrana y método de gelificación de LAL (*Lisado de Amebocitos de Limulus*).

4.2 ESPECÍFICOS

- Obtener la evidencia documentada de que la prueba de esterilidad es repetible, reproducible, robusta; y que cumple con los parámetros establecidos por la USP.
- Comprobar que cada lote de medio deshidratado utilizado en la prueba de esterilidad, contiene los nutrientes necesarios para promover los microorganismos empleados en el estudio.
- Demostrar que la actividad bacteriostática y fungistática propia de los tres productos parenterales, no afecta adversamente la veracidad de la prueba de esterilidad.
- Obtener la evidencia documentada que confirme que la prueba de endotoxinas por el método de gelificación LAL (*Lisado de Amebocitos de Limulus*), cumple con los criterios de especificidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección y solidez.

- Realizar el ensayo de rótulo para verificar la sensibilidad del reactivo LAL, utilizado en la validación.
- Determinar las posibles interferencias que puedan inhibir la detección de endotoxinas, mediante las pruebas de SPIKE & UNSPIKE.
- Determinar la máxima dilución que se le puede hacer a la muestra de los tres productos, y determinar la dilución de trabajo para detectar endotoxinas bacterianas mediante el método de LAL, para los ensayos de rutina.

5. METODOLOGÍA

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1.1 Muestra.

Los productos seleccionados par estas pruebas fueron: Ivermectina 1%, Boldenona, Vitavecol A y Calmadex. Fueron muestreados al azar, tomando 10 muestras de un mismo lote, correspondientes al inicio, mitad y final de la producción para la realización de la validación de la prueba de esterilidad. Para la validación de la prueba de LAL se tomaron tres muestras de tres lotes diferentes, correspondientes al inicio, mitad y final de la producción.

5.1.2 Número de réplicas

5.1.2.1 Prueba bacteriostasis y fungistasis:

Con el objeto de comprobar la reproducibilidad y repetibilidad de la prueba de bacteriostasis y fungistasis se realizaron 10 réplicas de cada prueba con sus respectivos controles positivos y negativos los cuales buscaron confirmar la precisión, sensibilidad y especificidad utilizando 100 ml del producto a probar, con 6 microorganismos diferentes. Como se indica en la USP XXVII. 2003

5.1.2.2 Ensayo del rótulo del reactivo de LAL y del operario analista:

Con el objeto de comprobar la repetibilidad, reproducibilidad, precisión y robustez se realizaron 4 réplicas. Como se indica en la USP XXVII. 2003

5.1.2.3 Ensayo preliminar Spike & Unspike:

Con el objeto de comprobar la repetibilidad, reproducibilidad, precisión y robustez se realizaron dos réplicas de cada uno. Como se indica en la USP XXVII.2003

5.1.2.4 Ensayo del rótulo del producto:

Con el objeto de comprobar la repetibilidad, reproducibilidad, precisión y robustez se realizaron 4 réplicas. Como se indica en la USP XXVII. 2003

5.1.2.5 Ensayo de rutina:

Este ensayo se realizó por duplicado, a fin de verificar la idoneidad de la dilución de trabajo, como se indica en la USP XXVII. 2003

5.1.3 Análisis estadístico

Se basa en el análisis del nivel de sensibilidad de LAL calculando la media geométrica (MG) y la desviación estándar (DE) de los logaritmos de los puntos finales, los cuales son los últimos tubos de la serie de réplicas que dan un resultado positivo en la prueba de endotoxinas bacterianas por el método de LAL. Donde la media geométrica debe ser $(0.5\lambda-2\lambda)$ (Associates of Cape Code, Inc. 1997), donde λ significa la sensibilidad del LAL ya que el error del método es de +/- 1 dilución. La USP y la FDA han establecido que la desviación estándar para cuatro réplicas, con un límite superior del 99% es de 0.365, los resultados menores a este límite de confianza estadístico se considera con variabilidad bajo control. (Food and Drugs Administration N° XXI. 1194, USP XXVII 2003)

5.1.3 1. EJEMPLO

PARA OXITETRACICLINA 50 mg/mL

5.1.3.1.1 Caracterización del producto

- Para realizar este cálculo se debe referenciar al límite de endotoxina permitido por la farmacopea oficial, para cada producto.
- Para ello se realiza el siguiente cálculo:

Máxima Dilución Valida M.D.V. = $\frac{\text{Límite de endotoxina}}{\text{Sensitividad de LAL } (\lambda)}$

Si el límite de la endotoxina es expresado en UE/mg o UE/UI, la potencia del producto debe ser incluida en la formula:

M.D.V. = $\frac{\text{Límite de endotoxina x concentración}}{\text{Sensitividad de LAL } (\lambda)}$

Límite de endotoxina según la Farmacopea: $0.4 \text{ UE/mg} \times 50\text{mg/ml} = 20 \text{ UE/ml}$

$$\text{M.D.V.} = \frac{20 \text{ UE/ml}}{0.25 \text{ UE/ml}} = 80 \text{ } 1/80$$

5.1.3.1.2 Ensayo preliminar SPIKE & UNSPIKE

- UNSPIKE

Se deben marcar del 1 – 9 los tubos de ensayo. El tubo No 1 contiene 200 μl de producto puro, del tubo No 2 al No 7 colocar 100 μl de agua apirógena, además hacer diluciones seriadas del producto pasando 100 μl al siguiente tubo, descartando los últimos 100 μl del tubo 7. El tubo 8 lleva 100 μl de la dilución 1:80 (MDV). El tubo 9 es el control negativo.

Adicionar a todos los tubos 100 μl de reactivo de LAL. Agitar fuertemente la gradilla, incubar a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Durante 60 \pm 1 minuto. Leer tomando cada tubo cuidadosamente e invertirlo 180° angulares.

Tabla 5 Ensayo preliminar Unspike

1	2 (1:2)	3 (1:4)	4 (1:8)	5 (1:16)	6 (1:32)	7 (1:64)	8 (1:80)	9 C-
200 μl producto	100 μl Agua apirógena	100 μl Agua apirógena	100 μl Agua apirógena	100 μl Agua apirógena	100 μl Agua apirógena	100 μl Agua apirógena	100 μl Producto diluido	100 μl Agua apirógena
100 μl LAL	100 μl LAL	100 μl LAL	100 μl LAL	100 μl LAL	100 μl LAL	100 μl LAL	100 μl LAL	100 μl LAL

- SPIKE (Por duplicado) Muestra diluida en endotoxina.

Se deben marcar del 1 – 9 los tubos de ensayo. El tubo No 1 contiene 190 μl de producto puro más 10 μl de endotoxina 10 UE/mL. . Del tubo No 2 al tubo No 7 colocar 100 μl de endotoxina 0.5 UE/ml. Y del tubo 1 al 7 hacer diluciones seriadas del producto pasando 100 μl al siguiente tubo, descartando los últimos 100 μl del tubo No 7. El tubo No 8 lleva 190 μl del producto diluido 1:80 (MDV) más 10 μl de endotoxina 10 UE/ml. El tubo No 9 es el control negativo, por ello lleva 100 μl de agua apirógena.

Adicionar a todos los tubos 100 µl de reactivo de LAL. Agitar fuertemente la gradilla, incubar 37+/- 1°C durante 1 hora. Leer tomando cada tubo cuidadosamente e invertirlo 180° angulares.

Tabla 6 Ensayo preliminar Spike

1	2 (1:2)	3 (1:4)	4 (1:8)	5 (1:16)	6 (1:32)	7 (1:64)	8 (1:80)	9 C-
190µl Producto + 10µl Endo 10UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	190µl Producto diluido + 10µl Endo 10UE/ml	100µl Agua apirógena
100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL

Tabla 7 Resultados de ensayos preliminares

Ensayo	DILUCIONES DEL PRODUCTO OXITETRACICLINA									
	Replica	Sin Diluir	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:80	Control Negativo
UnSpike	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spike	1	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	2	-	-	-	-	-	+	+	+	-

Los resultados anteriores indican que es un producto sin endotoxinas bacterianas, y que presenta inhibición a diluciones menores de 1:16, por lo cual no debe trabajarse ese rango.

5.1.3.1.3 Ensayo del Rótulo del producto

Se debe tener en cuenta que la máxima dilución válida no debe ser superada y la sensibilidad debe estar confirmada dentro del rango 2λ - 0.5λ .

Colocar en una gradilla tubos 10 x 77 mm 4 filas cada una de 6 tubos y marcar 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 y C- (Control negativo). Posteriormente adicionar 100 µl de la dilución de trabajo a cada tubo y luego agregar 100 µl de concentración 2 UE/mL al primer tubo y pasar 100 µl al segundo y

así sucesivamente hasta tener un volumen final en cada tubo de 100 µl. Finalmente agregar 100 µl del reactivo de LAL.

Tabla 8 Procedimiento para ensayo del Rótulo

1	0.5	0.25	0.125	0.06	C-
100 µl del producto diluido(dt)+ 100µl Endo 2 UE/ml	100 µl del producto diluido(dt)+ 100 µl Endo 1 UE/ml	100 µl del producto diluido(dt)+ 100 µl Endo 0.5 UE/ml	100 µl del producto diluido(dt)+ 100 µl Endo 0.25 UE/ml	100 µl del producto diluido(dt)+ 100 µl Endo 0.125 UE/ml	100 µl de agua apirógena
100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL

Agitar fuertemente la gradilla, incubar a 37+/-1°C durante 60+/- 1 minuto.

Leer tomando cada tubo cuidadosamente e invertirlo 180° angulares.

Según los resultados anteriores:

Límite de endotoxina. 20UE/ml

Dilución de trabajo: 1:80

Sensibilidad del LAL: 0.25 UE/ml

Potencia endotoxina: 5000 UE/ml

Tabla 9 Resultado del Ensayo del Rótulo

Concentración de endotoxina	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	Control negativo	Punto final	Log. Punto final	Especificación
Replica 1	+	+	+	-	-	-	0.25	-0.6020	M.G= 0.5λ-2λ
Replica 2	+	+	-	-	-	-	0.5	-0.310	
Replica 3	+	+	-	-	-	-	0.5	-0.3010	D.S= - 0.365
Replica 4	+	+	+	-	-	-	0.25	0.6020	
								Σ Pfinal=-1.806 1.806/4=-0.4515 Antilog Promedio=M:G Antilog 0.4515= 0.3535 M:G=0.3535	

$$M.G = \text{AntiLog} \frac{\sum e}{F} : \frac{\sqrt{\sum e^2 - (\sum e)^2/2}}{F-1}$$

Donde e: Log₁₀ de los puntos finales

F: No de replicas

5.1.4 Variables

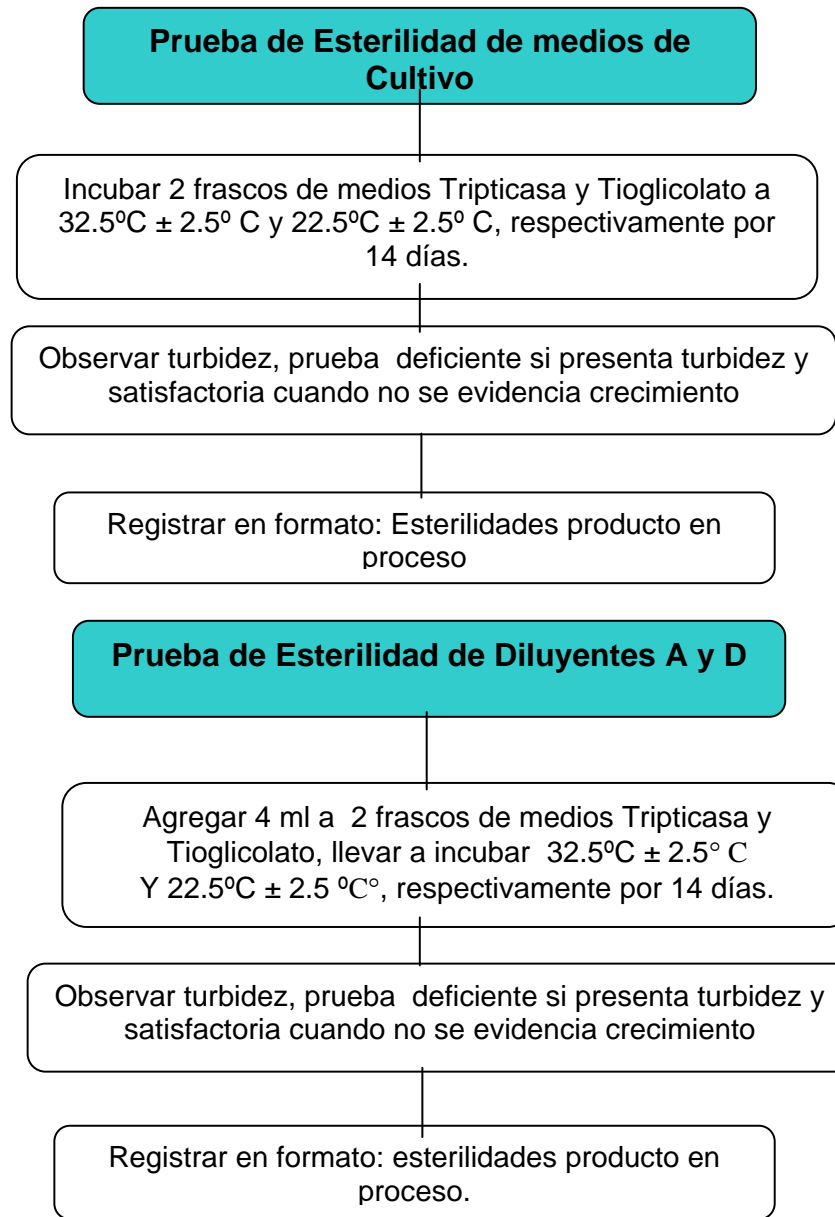
5.1.4.1 Variables Dependientes

Es aquella que refleja cualquier efecto que pueda acompañar el manejo de la variable independiente. (Daniel, 1981). En este caso las variables para la prueba de LAL son la cantidad de endotoxinas de los productos, la sensibilidad de LAL, la potencia de la endotoxina. Para la prueba de esterilidad son: El número de lavados

5.1.4.2 Variable independiente

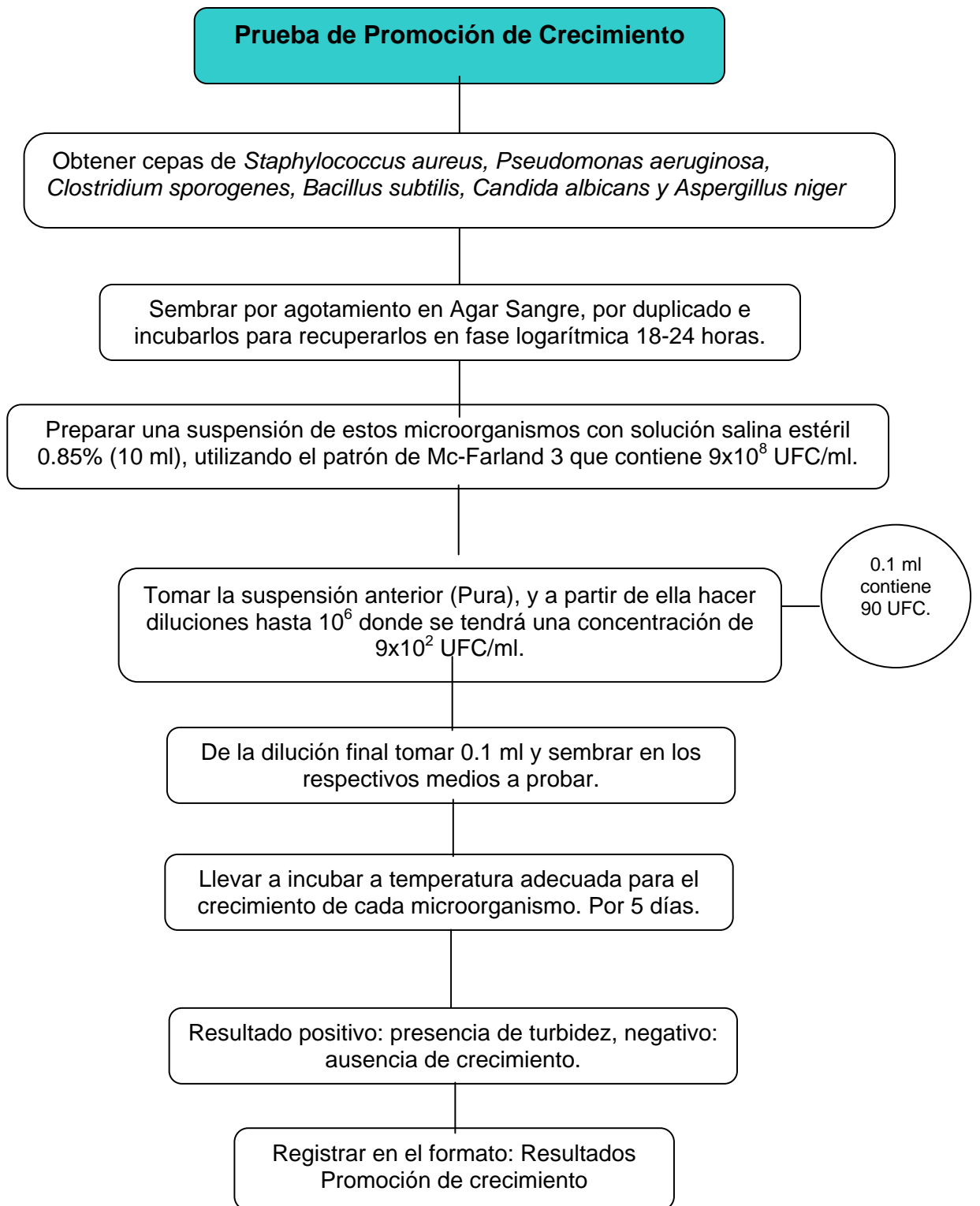
Es aquella que el investigador puede tener bajo control (Daniel, 1981). En este caso las variables independientes son: el lote, el producto, el material de vidrio con el que se va a trabajar, el número de replicas. Para la prueba de esterilidad son: El lote, el producto, el material estéril, el conjunto de microorganismos.

5.2 VALIDACIÓN DE PRUEBA DE ESTERILIDAD

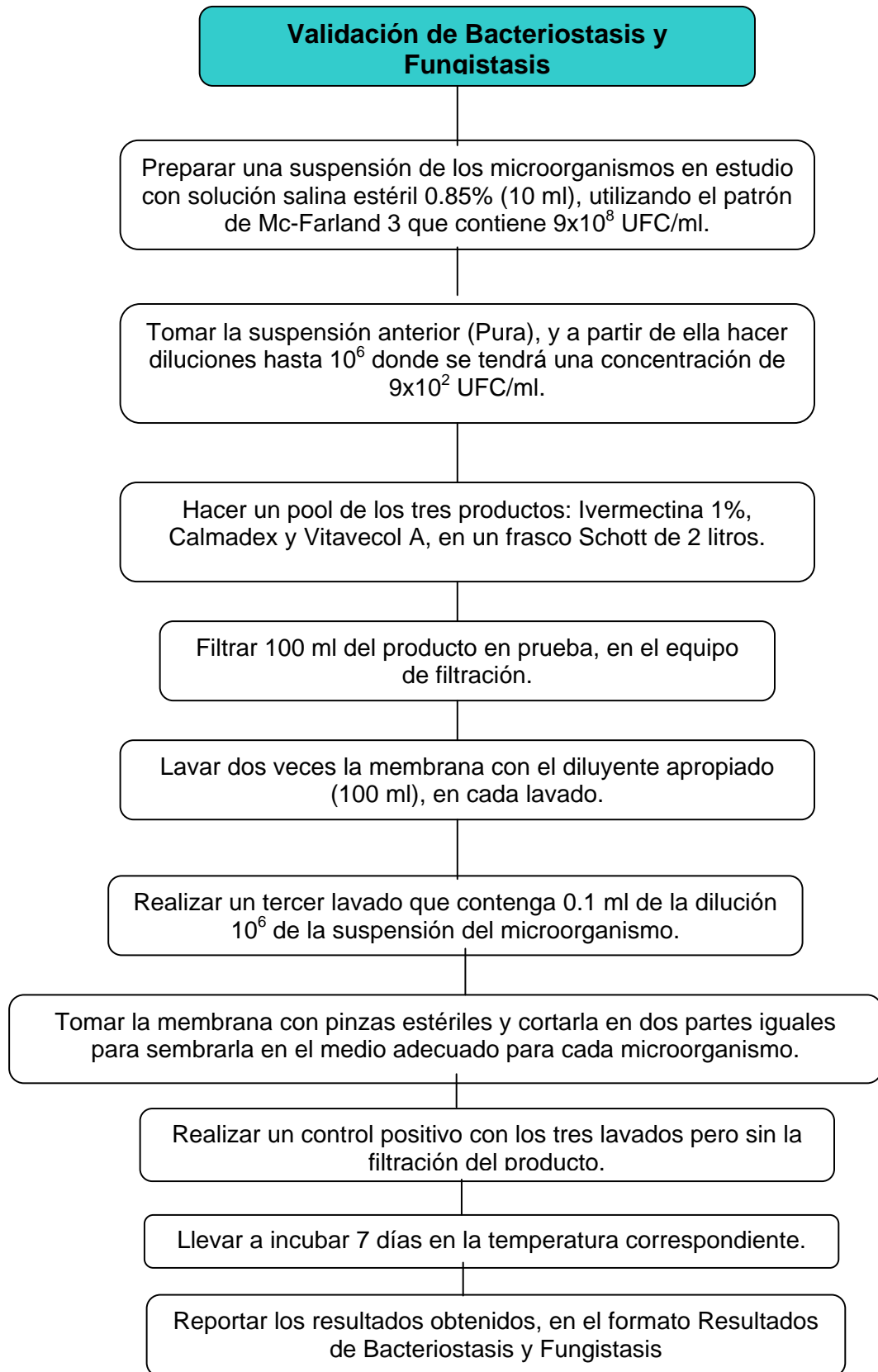


Ver Anexo 1

Figura 6 Prueba de Esterilidad de medios de cultivo

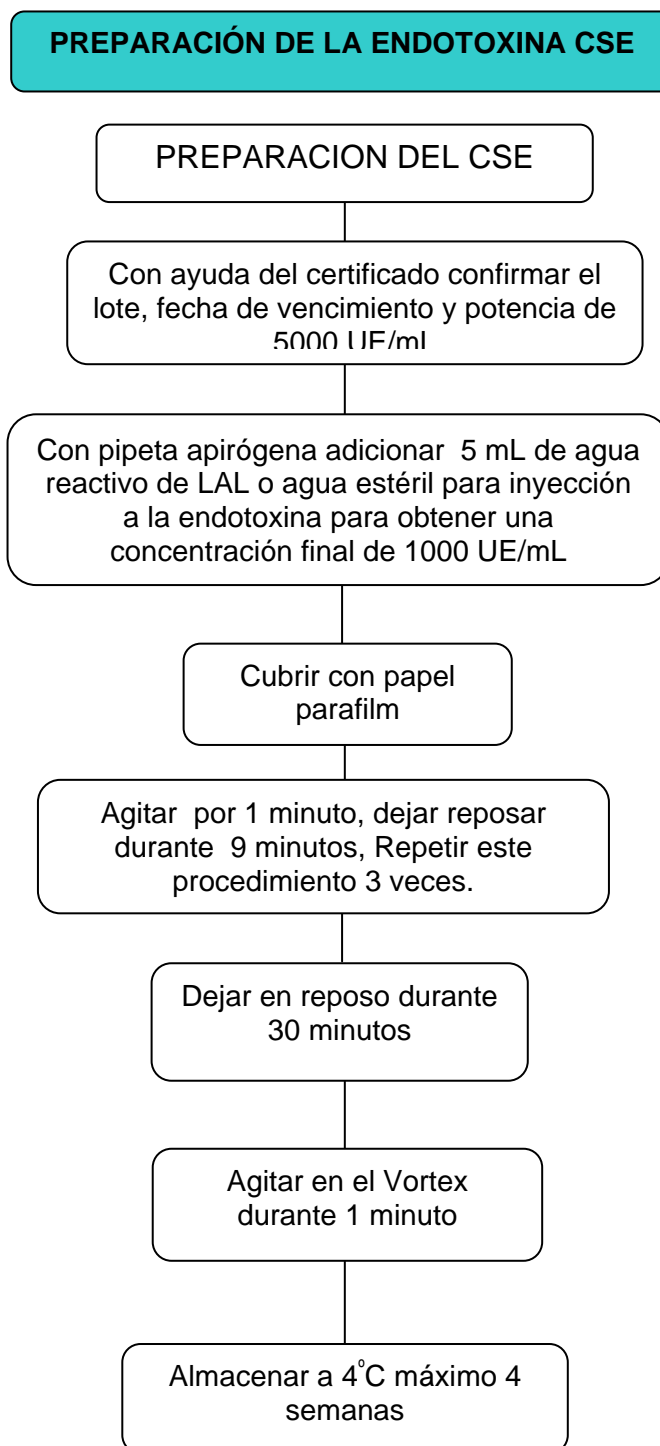


Ver anexo 2 Figura 7 Prueba de Promoción de crecimiento



Ver anexo 3 **Figura 8 Validación de Bacteriostasis y fungistasis**

5.3 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA LAL



Ver Anexo 4. Figura 9 Preparación de la Endotoxina CSE

Ensayo del Rótulo

DILUCIONES DEL CONTROL DE LA ENDOTOXINA ESTANDAR
Al realizar cada dilución se debe mezclar fuertemente en el vortex

DILUCIONES

Dilución A (10UE/mL = 40λ): Con el vial de endotoxinas reconstituido con (1000 UE/mL), hacer diluciones 1: 100: 100μmL (1000 UE/mL) + 9.9 mL de agua de reactivo de LAL (agua para inyección estéril)

Dilución B (1.0UE/mL= 4λ): Realizar dilución 1: 10: 1mL de la dilución A + 9 mL de agua de reactivo de LAL (agua para inyección estéril)

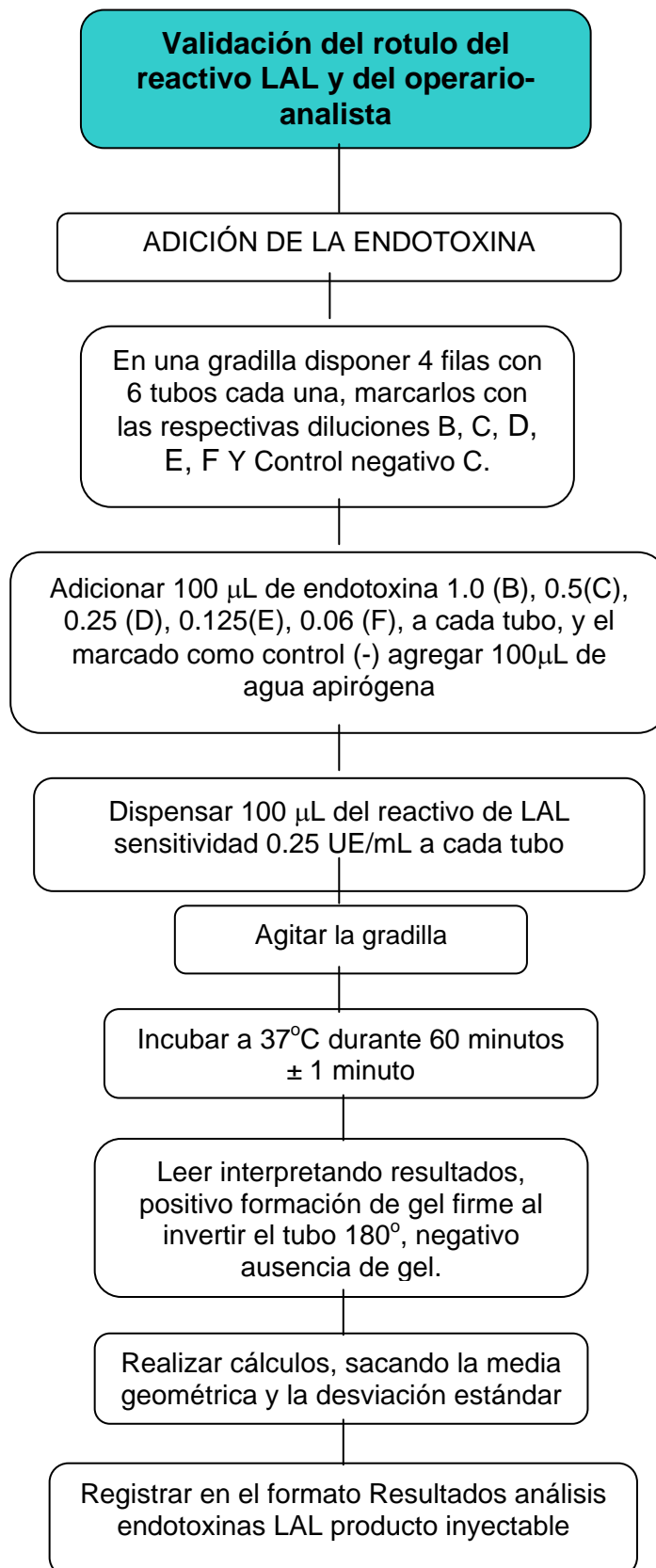
Dilución C (0.5 UE/mL = 2λ): Realizar dilución 1: 2: 1mL de la dilución B + 1 mL de agua de reactivo de LAL (agua para inyección estéril)

Dilución D (0.25 UE/mL = 1λ): Realizar dilución 1: 2: 1mL de la dilución C + 1 mL de agua de reactivo de LAL (agua para inyección estéril)

Dilución E (0.125 UE/mL = 0.5λ): Realizar dilución 1: 2: 1mL de la dilución D + 1 mL de agua de reactivo de LAL (agua para inyección estéril)

Dilución F (0.06 UE/mL = 0.25λ): Realizar dilución 1: 2: 1mL de la dilución E + 1 mL de agua de reactivo de LAL (agua para inyección estéril)

Ver anexo 5
Figura 10 Ensayo del Rótulo



Ver anexo 5. Figura 11 Validación del rotulo del reactivo LAL y del operario-analista

Caracterización del producto

Se debe conocer la máxima dilución permitida para la muestra según la Farmacopea XXVII

ENSAYOS PREELIMINARES

SPIKE (Por duplicado)

Colocar en la gradilla 9 tubos, marcarlos del 1- 9

El tubo 1 contiene 190 μ L del producto más 10 μ L endotoxina 10 UE/mL.

De tubo 2-7 100 μ L de endotoxina 0.5 UE/mL.

Del tubo 1 al 7 hacer diluciones seriadas del producto pasando 100 μ L al siguiente tubo, descartando los últimos 100 μ L del tubo 7

El tubo 8 contiene 190 μ L de la MDV más 10 μ L endotoxina 10 UE/mL. Descartar 100 μ L.

El tubo 9 es control negativo

UNSPIKE (Por duplicado)

Colocar en la gradilla 9 tubos, marcarlos del 1- 9

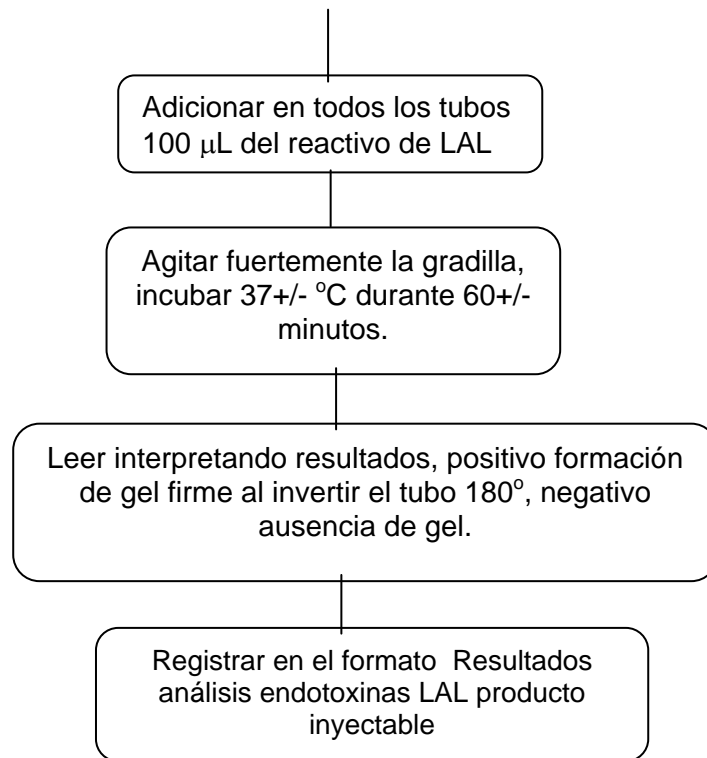
El No 1 contiene 200 μ L del producto puro

Del tubo 2 al 7 colocar 100 μ L de agua apirógena

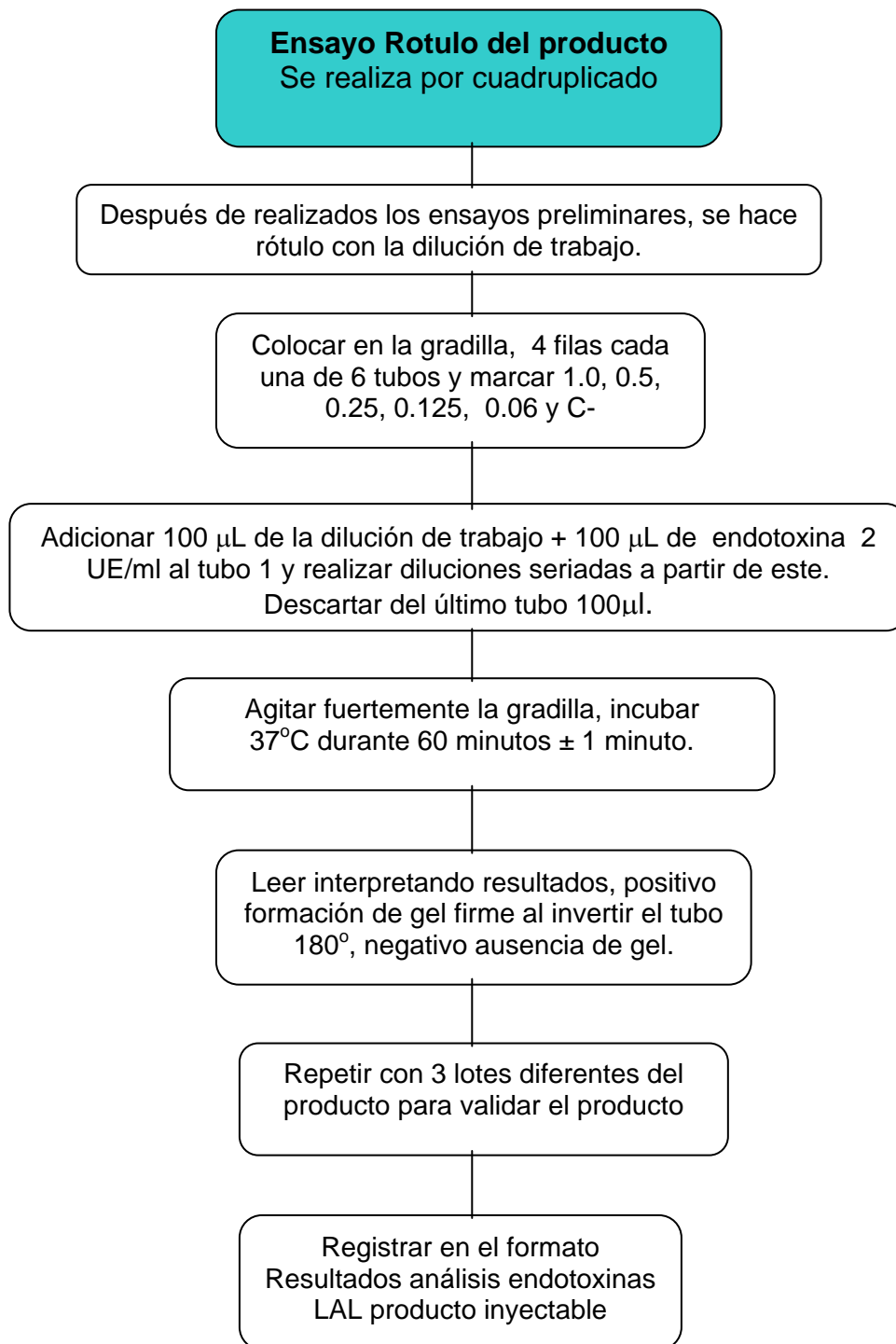
Del tubo 1 al 7 hacer diluciones seriadas del producto pasando 100 μ L al siguiente tubo, descartando los últimos 100 μ L del tubo 7

El tubo 8 lleva 100 μ L de producto diluido según la MDV.

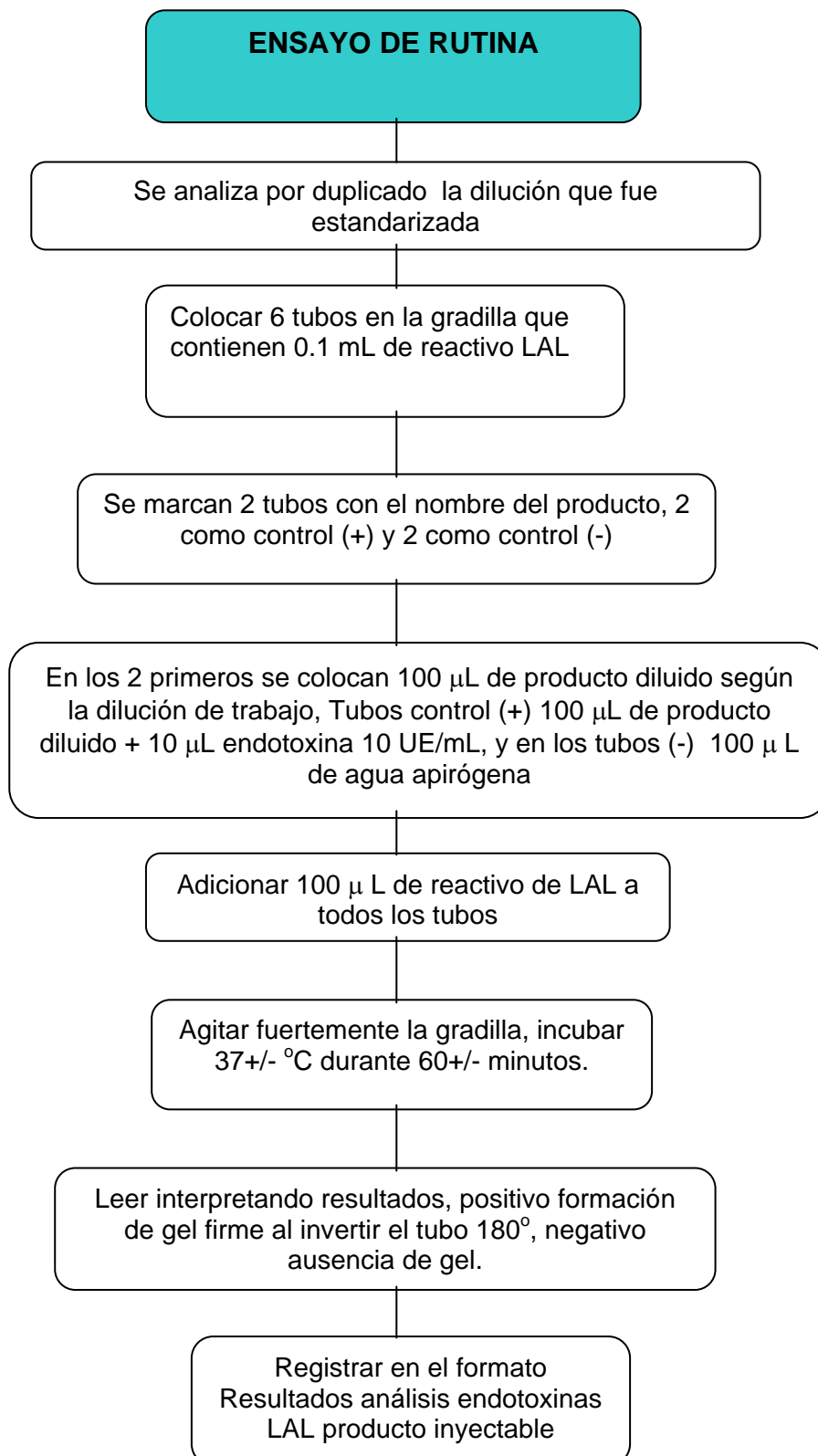
El tubo 9 es el control negativo



Ver anexo 6 y 7
Figura 12 Caracterización del Producto



Ver anexo 8
Figura 13 Ensayo Rotulo del producto



Ver anexo 9 Figura 14 Ensayo de rutina

6. RESULTADOS

6.1 ESTERILIDAD

La prueba de esterilidad que se validó, fue la de filtración por membrana ya que ésta técnica es la más recomendable para realizar pruebas de esterilidad según las farmacopeas USP, BP y OMS.

Los medios de cultivo que se utilizaron durante las pruebas fueron: caldo tioglicolato para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Clostridium sporogenes*, que se incubaron a una temperatura de $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$; y caldo casoy para *Aspergillus Níger*, *Candida albicans* y *Bacillus subtilis*, incubados a temperatura ambiente.

Por otra parte se realizó la prueba de promoción de crecimiento con cada uno de los microorganismos de la Tabla No. 2, donde se verificó que los medios utilizados contenían los nutrientes necesarios para promover el crecimiento de los microorganismos; el cual se evidenció por turbidez, confirmando su morfología mediante coloraciones de Gram. El caldo tioglicolato, tiene en sus componentes la cisteína y el tioglicolato, que son sustancias reductoras, las cuales brindan una anaerobiosis suficiente, incluso para anaerobios exigentes, además los grupos sulfhídrico inactivan componentes de arsénico, mercurio y demás metales pesados, su alta viscosidad impide la penetración rápida de oxígeno, cuando esto ocurre se manifiesta un color rojizo debido al indicador redox de resazurina sódica; contiene a su vez un alto número de nutrientes, la dextrosa como fuente de carbono, el cloruro de sodio como agente isotónico, el digerido pancreático y el extracto de levadura como fuentes de nitrógeno.

El caldo tripticasa de soya (Casoy), contiene nutrientes como el digerido pancreático de caseína, dextrosa como fuente de carbono, digerido papaínico de soya, solución buffer fosfato disódico de potasio y cloruro de sodio como agente isotónico, es un medio altamente nutritivo apto para el crecimiento de hongos y levaduras. Además es un medio de cultivo universal, el cual esta exento de sustancias inhibitorias y de indicadores.

Los caldos se inocularon con un pequeño número de microorganismos (10-100 UFC/ ml) como se indica en la farmacopea, confirmado por el recuento en agar sangre y agar plate count, los cuales son medios nutritivos que garantizan el crecimiento de las bacterias, levaduras y hongos utilizados. Para conocer el número aproximado de hongos y bacterias inoculadas se midió la transmitancia de las suspensiones enfrentadas al patron de Mc Farland respectivo, la cual estuvo entre un rango de 14-16% para *C. albicans*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*; se utilizó un rango de 4-6% para *C. Sporogenes* y *A. Níger*.



Figura 15 Crecimiento *Bacillus subtilis*

Los microorganismos usados para la inoculación no tenían más de cinco pases de la semilla original, lo que nos permitió asegurar la viabilidad de los mismos. Estos se utilizaron en fase exponencial para garantizar su crecimiento, para el caso de *Aspergillus níger* éste se trabajo en ideofase

con el objeto de obtener conidios los cuales son las estructuras de resistencia y de reproducción.

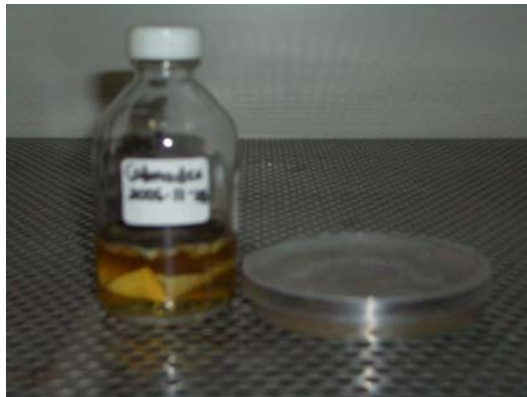


Figura 16 Prueba de Bacteriostasis y fungistasis del Calmadex

Antes de realizar la validación de fungistasis y bacteriostasis a los productos se le realizaron pruebas de esterilidad a cada lote utilizado, las cuales fueron satisfactorias, demostrando la viabilidad de estos para el proyecto.

Las membranas utilizadas fueron diferentes para cada producto, debido a la composición de los mismos; con calmadex se utilizaron membranas para filtración de aguas, los cuales están fabricados de nitrato de celulosa debido a la naturaleza acuosa del producto; para el Vitavecol se utilizaron membranas utilizadas en la filtración de oleos, por ser productos aceitosos ya que están compuestas de nitrato de celulosa; y finalmente para la ivermectina se utilizaron membranas especiales de fluoruro de polivinilideno ya que el producto es de carácter semi-oleoso; todas con un tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$ y un diámetro de membrana de 47 mm, a excepción de la de vitavecol A que tiene un tamaño de poro $0.22\mu\text{m}$; apto para el tipo de microorganismos utilizados, ya que el poro de $0.22\mu\text{m}$ es utilizado para microorganismos de tamaño muy pequeño como *Pseudomonas diminuta*. Es de vital importancia elegir la membrana adecuada que se va a utilizar para la filtración de cada producto, de

acuerdo a su naturaleza para permitir la recuperación de los microorganismos en la misma.

Una vez realizadas las pruebas bacteriostáticas y fungistáticas se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 10. Resultados Pruebas de Bacteriostasis y fungistasis *A. niger* y *C. sporogenes*

Microorga Nismo	<i>Aspergillus niger</i> Dilución 10 ⁴ Patrón McFarland 4					<i>Clostridium sporogenes</i> Dilución 10 ⁴ Patrón McFarland 4				
	IVE	VIT	DD	CAL	DA	IVE	VIT	DD	CAL	DA
R1	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-
Rto	0	0		0		4	4		4	
R2	+	+	+	+	+	C	-	-	-	-
Rto	12	12		12		0	0		0	
R3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Rto	24	24		24		0	0		0	
R4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Rto	24	24		24		33	33		33	
R5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Rto	8	8		8		62	62		62	
R6	+	+	+	+	+	-	C	-	-	-
Rto	6	6		6		62	62		62	
R7	+	C	+	+	+	-	-	-	-	-
Rto	6	6		6		25	25		25	
R8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Rto	6	6		6		25	25		25	
R9	+	+	+	+	+	-	C	-	-	-
Rto	58	58		58		25	25		25	
R10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	58	58		58		0	0		0	
R11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Rto	8	7		8		0	0		0	
R12		-	+			-	-	+	+	+
Rto		7				0	0		0	
R13		+	+			+	+	+	+	+
Rto		23				M	M		M	
R14		+	+			+	+	+	+	+
Rto		23				M	M		M	
R15		+	+			+	+	+	+	+
Rto		8				342	342		342	
R16						+	+	+	+	+
Rto						342	342		342	
R17						+	-	+	+	+
Rto						342	342		342	
R18						+	+	+	+	+
Rto						65	65		65	
R19						+	+	+	+	+
Rto						65	65		65	
R20							+	+	+	+
Rto							65		65	
R21							+	+		
Rto							65			

IVE: Ivermectina VIT: Vitavecol CAL: Calmadex DD: Control positivo Diluyente D
DA: Control positivo Diluyente A R#: Réplica # Rto: Recuento +: Positivo -: Negativo M: Masivo
C: Contaminado C+: Contaminado con crecimiento del microorganismo esperado

Tabla 11. Resultados Pruebas de Bacteriostasis y fungistasis *B. subtilis* y *C. albicans*

Microorga nismo	<i>Bacillus subtilis</i> Dilución 10 ⁶ Patrón McFarland 3					<i>Candida albicans</i> Dilución 10 ⁶ Patrón McFarland 3				
	IVE	VIT	DD	CAL	DA	IVE	VIT	DD	CAL	DA
R1	+	C	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	4	4		4		1	1		1	

R2	-	-		-		+	+	+	+	+
Rto	1	1		1		27	27		27	
R3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	M	M		M		27	27		27	
R4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	M	M		M		27	27		27	
R5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	M	M		M		C	C		C	
R6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	M	M		M		C	C		C	
R7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	M	M		M		2	2		2	
R8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Rto	M	M		M		2	2		2	
R9	+	+	+	+	+	+		+		+
Rto	M	M		M		2			2	
R10	+	-		+	+	+	+	+	+	+
Rto	M	M		M		2	2		2	
R11	+	-		+	+				+	+
Rto	M	M		M					2	
R12		+								
Rto		25								
R13		+								
Rto		25								
R14		+								
Rto		25								

IVE: Ivermectina VIT: Vitavecol CAL: Calmadex DD: Control positivo Diluyente D
 DA: Control positivo Diluyente A R#: Réplica # Rto: Recuento +: Positivo -: Negativo M: Masivo
 C: Contaminado C+: Contaminado con crecimiento del microorganismo esperado

Tabla 12. Resultados Pruebas de Bacteriostasis y fungistasis *P. aeruginosa* y *S. aureus*

Microorganismo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Dilución 10 ⁶ Patrón McFarland 3					<i>Staphylococcus aureus</i> Dilución 10 ⁶ Patrón McFarland 3				
	IVE	VIT	DD	CAL	DA	IVE	VIT	DD	CAL	DA
R1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	536	536		536		46	46		46	
R2	C	C	C4	C		C	C	C	C	C
Rto	69	69		69		15	15		15	
R3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	42	42		42		72	72		72	
R4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	52	52		52		91	91		91	
R5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	52	52		52		91	91		91	
R6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	62	62		62		119	119		119	
R7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	62	62		62		119	119		119	
R8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	68	68		68		57	57		57	
R9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	68	68		68		57	57		57	
R10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	70	70		70		74	74		74	
R11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rto	70	70		70		74	74		74	

IVE: Ivermectina VIT: Vitavecol CAL: Calmadex DD: Control positivo Diluyente D
 DA: Control positivo Diluyente A R#: Réplica # Rto: Recuento +: Positivo -: Negativo M: Masivo
 C: Contaminado C+: Contaminado con crecimiento del microorganismo esperado

6.2 RESULTADOS LAL

Por otra parte también se realizó la validación de la técnica de endotoxinas bacterianas por medio del método de lisado de amebocitos de *limulus* LAL, para los siguientes productos: Boldenona, Calmadex y Vitavecol A, no se evaluó Ivermectina porque este producto ya había sido validado.

ESPECIFICACIONES:

- Media geométrica: < 0.365
- Desviación estándar: $(0.5\lambda - 2\lambda) = (0.125 - 0.5)$

6.2.1 Boldenona

6.2.1.1 Resultado ensayo de rotulo y validación del operario:

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA

LOTE: 97

LAL PYROTELL SENSIBILIDAD: 0.25 λ

LOTE: 504-08-341

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 13. Resultado del ensayo del rótulo

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	+	-	-	-	0,25
2	+	+	+	-	-	-	0,25
3	+	+	+	-	-	-	0,25
4	+	+	-	-	-	-	0,5
						Media geométrica	0,297
Especificaciones						Desviación estándar	0,13
Media geométrica			+/- 1 λ				
Desv. Estándar			<0.365				

Se realizó la confirmación de sensibilidad del LAL y la validación del operario por cuadruplicado, donde los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

6.2.1.2 Caracterización del producto

Límite de Endotoxina del producto: 450

Máxima Dilución Valida M.D.V. = Límite de endotoxina

Sensibilidad de LAL (λ)

Máxima Dilución Valida M.D.V. = 450 UE/ml

0.25 UE/ml

Máxima Dilución Valida M.D.V. = 1800 1:1800

Se calculó la máxima dilución válida para encontrar la mayor dilución permitida en la que se puede determinar el límite de endotoxina de la muestra.

6.2.1.3 Resultados de ensayos preliminares SPIKE Y UNSPIKE

Tabla 14. Resultado del Unspike y Spike de la Boldenona

DILUCIONES DE PRODUCTO														
Ensayo	Réplica	Sin diluir	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/1800	C-
Unspike	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spike	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Dilución de trabajo: 1:1000

En los ensayos preliminares de Spike y Unspike se determinó la dilución de trabajo y la ausencia de endotoxinas del producto.

6.2.1.4 Ensayo de validez del producto

6.2.1.4.1 Producto: Boldenona

LOTE: BDN-014

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA LOTE: 97

LAL Pyrotell sensibilidad: 0.25 λ

LOTE: 504-08-341

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 15. Resultado de la validación de la Boldenona Lote BDN-014

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	+	+	-	-	0,125
2	+	+	+	+	-	-	0,125
3	+	+	+	+	-	-	0,125
4	+	+	+	+	-	-	0,125
						Media geométrica	0,125
Especificaciones						Desviación estándar	0
Media geométrica			+/- 1λ				
Desv. Estándar			<0.365				

6.2.1.4.2 Producto: Boldenona

LOTE: BDN-017

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA

LOTE: 97

LAL Pyrotell sensibilidad: 0.25λ

LOTE: 504-08-341

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 16. Resultado de la validación de la Boldenona Lote BDN-017

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	-	-	-	-	0,5
2	+	+	-	-	-	-	0,5
3	+	+	-	-	-	-	0,5
4	+	+	-	-	-	-	0,5
						Media geométrica	0,5
Especificaciones						Desviación estándar	0
Media geométrica			+/- 1λ				
Desv. Estándar			<0.365				

6.2.1.4.3 Producto: Boldenona

LOTE: BDN-018

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA

LOTE: 97

LAL Pyrotell sensibilidad: 0.25λ

LOTE: 504-08-341

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 17. Resultado de la validación de la Boldenona Lote BDN-018

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	+	+	-	-	0,125
2	+	+	+	-	-	-	0,25
3	+	+	+	+	-	-	0,125
4	+	+	+	-	-	-	0,25
Especificaciones						Media geométrica	0,177
Media geométrica			+/- 1λ			Desviación estándar	0,07
Desv. Estándar			<0.365				

En los ensayos de validez se enfrentó la dilución de trabajo con el reactivo de LAL para confirmar su sensibilidad.

6.2.2 Vitavecol A

6.2.2.1 Resultado ensayo de rótulo

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA

LOTE: 97

LAL Pyrotell sensibilidad: 0.25λ

LOTE: 504-08-341

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 18. Resultado del ensayo del rótulo

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	+	-	-	-	0,25
2	+	+	+	-	-	-	0,25
3	+	+	+	-	-	-	0,25
4	+	+	-	-	-	-	0,5
Especificaciones						Media geométrica	0,297
Media geométrica			+/- 1λ			Desviación estándar	0,13
Desv. Estándar			<0.365				

Se realizó la confirmación de sensibilidad del LAL y la validación del operario por cuadruplicado, donde los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

6.2.2.2 Caracterización del producto

Límite de Endotoxina del producto: 0.007

Máxima Dilución Valida M.D.V. = Límite de endotoxina

Sensibilidad de LAL (λ)

Máxima Dilución Valida M.D.V. = 0.007UE/ml * 600.000UI/ml

0.25 UE/ml

Máxima Dilución Valida M.D.V. = 16800 1:16800

Se calculó la máxima dilución válida para encontrar la máxima dilución permitida en la que se puede determinar el límite de endotoxina de la muestra.

6.2.2.3 Resultados de ensayos preliminares SPIKE Y UNSPIKE

Tabla 19. Resultado del Unspike y Spike del Vitavecol A

DILUCIONES DE PRODUCTO																		
Ensayo	R	Sin diluir	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192	1/16384	1/32768	C-
Unspike	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spike	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

R: Réplica

Dilución de trabajo: 1:8000

En los ensayos preliminares de Spike y Unspike se determinó la dilución de trabajo y la ausencia de endotoxinas del producto.

6.2.2.4 Ensayo de validez del producto

6.2.2.4.1 Producto: Vitavecol A

LOTE: VTA-032

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA

LOTE: 97

LAL Pyrotell sensibilidad: 0.25 λ

LOTE: 504-08-341

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 20. Resultado de la validación del Vitavecol A Lote VTA-032

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	+	-	-	-	0,25
2	+	+	+	-	-	-	0,25
3	+	+	+	+	-	-	0,125
4	+	+	+	-	-	-	0,25
						Media	
Especificaciones						geométrica	0,21
Media geométrica			+/- 1λ			Desviación	
Desv. Estándar			<0.365			estándar	0,06

6.2.2.4.2 Producto: Vitavecol A

LOTE: VTA-033

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA

LOTE: 97

LAL Pyrotell sensibilidad: 0.25λ

LOTE: 504-11-350

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 21. Resultado de la validación del Vitavecol A Lote VTA-033

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	-	-	-	-	0,5
2	+	+	-	-	-	-	0,5
3	+	+	-	-	-	-	0,5
4	+	+	-	-	-	-	0,5
						Media	
Especificaciones						geométrica	0,5
Media geométrica			+/- 1λ			Desviación	
Desv. Estándar			<0.365			estándar	0

6.2.2.4.3 Producto: Vitavecol A

LOTE: VTA-034

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA

LOTE: 97

LAL Pyrotell sensibilidad: 0.25λ

LOTE: 504-08-341

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 22. Resultado de la validación del Vitavecol A Lote VTA-034

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	+	+	-	-	0,125
2	+	+	+	+	-	-	0,125
3	+	+	+	+	-	-	0,125
4	+	+	+	-	-	-	0,25
Especificaciones						Media geométrica	0,149
Media geométrica			+/- 1λ			Desviación estándar	0,06
Desv. Estándar			<0.365				

En los ensayos de validez se enfrentó la dilución de trabajo con el reactivo de LAL para confirmar su sensibilidad.

6.2.3 Calmadex

6.2.3.1 Resultado ensayo de rótulo

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA

LOTE: 97

LAL Pyrotell sensibilidad: 0.25λ

LOTE: 504-08-341

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 23. Resultado del ensayo del rótulo

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	+	-	-	-	0,25
2	+	+	+	-	-	-	0,25
3	+	+	+	-	-	-	0,25
4	+	+	-	-	-	-	0,5
Especificaciones						Media geométrica	0,2973
Media geométrica			+/- 1λ			Desviación estándar	0,125
Desv. Estándar			<0.365				

Se realizó la confirmación de sensibilidad del LAL y la validación del operario por cuadruplicado, donde los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

6.2.2.2 Caracterización del producto

Límite de Endotoxina del producto: 10UE/mg

Máxima Dilución Valida M.D.V. = Límite de endotoxina

Sensibilidad de LAL (λ)

Máxima Dilución Valida M.D.V. = 10 UE/mg * 150 mg

0.25 UE/ml

Máxima Dilución Valida M.D.V. = 6000 1:6000

Se calculó la máxima dilución válida para encontrar la máxima dilución permitida en la que se puede determinar el límite de endotoxina de la muestra.

6.2.3.3 Resultados de ensayos preliminares SPIKE Y UNSPIKE

Tabla 24. Resultado del Unspike y Spike del Calmadex

DILUCIONES DE PRODUCTO															
Ensayo	R	sin diluir	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/6000	C-
Unspike	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spike	1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

R: Réplica

Dilución de trabajo: 1:2000

En los ensayos preliminares de Spike y Unspike se determinó la dilución de trabajo y la ausencia de endotoxinas del producto.

6.2.3.4 Ensayo de validez del producto

6.2.3.4.1 Producto: Calmadex

LOTE: CMD-405

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA

LOTE: 97

LAL Pyrotell sensibilidad: 0.25 λ

LOTE: 504-08-341

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 25. Resultado de la validación del Calmadex Lote CMD-405

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	+	-	-	-	0,25
2	+	+	+	-	-	-	0,25
3	+	+	+	-	-	-	0,25
4	+	+	+	-	-	-	0,25
						Media geométrica	0,25
Especificaciones						Desviación estándar	0
Media geométrica			+/- 1λ				
Desv. Estándar			<0.365				

6.2.3.4.2 Producto: Calmadex

LOTE: CMD-406

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA

LOTE: 97

LAL Pyrotell sensibilidad: 0.25λ

LOTE: 504-08-341

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 26. Resultado de la validación del Calmadex Lote CMD-406

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	-	-	-	-	0,5
2	+	+	-	-	-	-	0,5
3	+	+	-	-	-	-	0,5
4	+	+	-	-	-	-	0,5
						Media geométrica	0,5
Especificaciones						Desviación estándar	0
Media geométrica			+/- 1λ				
Desv. Estándar			<0.365				

6.2.3.4.3 Producto: Calmadex

LOTE: CMD-408

CONTROL ESTÁNDAR DE LA ENDOTOXINA

LOTE: 97

LAL Pyrotell sensibilidad: 0.25λ

LOTE: 504-08-341

AGUA APIRÓGENA

LOTE: API-053

Tabla 27. Resultado de la validación del Calmadex Lote CMD-408

Concentración de endotoxina UE/ml							
Réplica	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C-	P. final
1	+	+	-	-	-	-	0,5
2	+	+	-	-	-	-	0,5
3	+	+	-	-	-	-	0,5
4	+	+	-	-	-	-	0,5
Especificaciones						Media geométrica	0,5
Media geométrica			+/- 1 λ			Desviación estándar	0
Desv. Estándar			<0.365				

En los ensayos de validez se enfrentó la dilución de trabajo con el reactivo de LAL para confirmar su sensibilidad.

7. DISCUSIÓN

Debido a que el fundamento de la prueba de esterilidad consiste en establecer un procedimiento para determinar la ausencia/presencia de microorganismos aerobios o anaerobios en un producto de uso parenteral, fue importante realizar los procedimientos asépticamente, teniendo en cuenta cada uno de los factores involucrados en la prueba como son: a) Esterilidad de medios de cultivo, b) Pruebas de promoción de crecimiento c) Validación de fungistasis y bacteriostasis d) Pruebas ambientales a la Cabina de flujo laminar.

Las pruebas de esterilidad que se le realizaron a los medios y diluyentes fueron de vital importancia ya que de ésta manera se comprobó la ausencia de microorganismos contaminantes lo que permitió su uso para la validación y a su vez como controles negativos.

En cuanto a las pruebas de promoción de crecimiento se pudo determinar que los medios utilizados a lo largo de las pruebas contenían los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo de los microorganismos.

La prueba de fungistasis y bacteriostasis se ejecutó con el fin de comprobar que la actividad bacteriostática y fungistática de los tres productos utilizados no afecta la veracidad de la prueba de esterilidad por el método de filtración por membrana; al igual que para conocer el número de lavados necesarios con el diluyente apropiado para inactivar las propiedades antimicrobianas que puedan tener los productos. De acuerdo con las Tablas No. 11 Y 12 se puede observar que para todas las suspensiones de microorganismos se utilizó el patrón de Mc-Farland 3 con una dilución 10^6 , excepto *Clostridium sporogenes* y *Aspergillus niger* (Tabla No. 10) que se trabajaron con el patrón de Mc-Farland 4 y dilución 10^4 , ya que de otra forma no se evidenció crecimiento y no era viable para realizar la prueba.

Las filtraciones realizadas se pueden clasificar en la categoría II de métodos analíticos ya que esta categoría incluye métodos para la determinación de impurezas como son los microorganismos en los tres productos farmacéuticos validados.

De acuerdo al procedimiento que se siguió se realizó una validación concurrente, ya que se llevo a cabo durante el proceso, se logró analizar inequívocamente los tres productos utilizados, lo que nos habla de la precisión de la prueba, ya que en presencia de impurezas tales como los microorganismos debidamente identificados se obtuvieron datos relativos a los productos; reproducibilidad, ya que las filtraciones se realizaron por dos analistas en diferentes días y en diferentes laboratorios, obteniendo resultados equivalentes; robustez, demostrada al realizar recuento de las suspensiones de microorganismos, ya que se verificó la cantidad de colonias inoculadas en la prueba de bacteriostasis y fungistasis recomendadas en la farmacopea ,(entre 10 y 100 UFC), lo que verifica también la sensibilidad de la prueba.

En la Tabla No. 12 se puede observar que los recuentos para *Pseudomonas aeruginosa* se encontraron dentro del rango de 10-100 ufc exigido por la farmacopea a excepción de la réplica No 1, esto se debió probablemente a un exceso de turbidez de la suspensión del microorganismo al compararlo con el patrón de Mc Farland No 3, que se corrigió posteriormente con las medida de transmitancias tanto del patrón como de la suspensión del microorganismo. En cuanto a la réplica No 2 aunque tuvo un recuento de 69 ufc, los controles y los caldos evidenciaron contaminación con bacilos Gram positivos.

Igualmente para *Staphylococcus aureus* la réplica No 2 no creció en los caldos debido a una contaminación en el medio y posiblemente su crecimiento fue inhibido.

Con referencia a *Candida albicans* (Tabla No.11) se pudo observar que los caldos contaminados con este microorganismo crecen con un pequeño número de colonias de 1-27 ufc, a excepción de la réplica No 8 de calmadex la cual tuvo un recuento de 2 ufc, esto se debió a que al producto no se le inoculó el microorganismo en el último lavado.

En comparación con *Candida albicans* los análisis realizados a *Bacillus subtilis* (Tabla No. 11) en la réplica No 2, 1 ufc no es suficiente para obtener resultados positivos en ningún producto; por otra parte se evidenciaron diferentes recuentos masivos debido a sus características morfológicas de crecimiento.

En cuanto a las pruebas realizadas con *Aspergillus niger* (Tabla No. 10) se logró determinar que se pueden obtener resultados positivos en un rango de 6 a 58 ufc como lo recomienda la farmacopea, a excepción de las réplicas No. 7 y 8 que se contaminaron probablemente por errores de manipulación con respecto a las membranas.

Finalmente para *Clostridium sporogenes*, (Tabla No. 10) en las réplicas 5-9, se obtuvieron recuentos positivos pero los productos no demostraron crecimiento debido a falta de anaerobiosis en los medios tioglicolato, esto se corrigió preparando un nuevo lote para las demás pruebas. En cuanto a los recuentos negativos de las réplicas 10 y 11, se atribuyeron a que en esas pruebas las cámaras de anaerobiosis no estaban funcionando adecuadamente.

Con base en los resultados obtenidos de 10 replicas de cada producto con los seis microorganismos utilizados, se demostró que tres lavados son suficientes para la recuperación de los microorganismos y que la actividad antimicrobiana inherente a los componentes de los productos calmadex, ivermectina y vitavecol A se neutraliza con este número de lavados, para el óptimo crecimiento de los gérmenes evaluados. Así es que, si alguno de los productos estuviera contaminado con alguna de las

bacterias y hongos trabajados se evidenciaría su crecimiento mediante la prueba de filtración con membrana realizando tres lavados a la membrana con el diluyente apropiado, después de haber filtrado el producto.

Hay que tener en cuenta que al realizar las filtraciones también se tenía un control ambiental y de superficies para asegurar que los medios de cultivo no se contaminaran por estos factores sino únicamente por los microorganismos inoculados; también fue fundamental utilizar equipos como incubadoras, neveras, autoclaves y balanzas validados y calibrados para asegurar su correcto funcionamiento.

Con relación a la prueba de LAL, es de vital importancia realizar la validación de la detección de endotoxinas bacterianas por el método de LAL ya que por medio de ésta se logra identificar la dilución de trabajo de cada producto para los ensayos de rutina que se le realizan a los productos inyectables terminados.

La validación se realizó por el método de gelificación por ser una prueba sencilla y rápida, además, en el laboratorio fabricante de los productos se realizan las pruebas de rutina por medio de esta metodología.

Para la validación del rótulo del reactivo y de los dos analistas se partió de la endotoxina pura que reconstituida en 5 ml contiene 5000 UE/vial lo que significa que por cada ml hay 1000 UE/ml, en estos ensayos se evaluaron diferentes concentraciones de endotoxina (1UE, 0.5 UE, 0.25 UE, 0.125 UE y 0.06 UE) con el objeto de confirmar la sensibilidad del reactivo de LAL 0.25 λ y donde se verificó también la destreza de los analistas para realizar correctamente las diluciones para obtener las diferentes concentraciones de endotoxina (Tabla No.13); esto se verificó mediante los resultados estadísticos donde la media geométrica obtenida de los logaritmos de los puntos finales, es decir, la última concentración donde se presentó la formación del gel, estuvo dentro del rango permitido de

(0.125 – 0.5) dando un resultado de 0.2973; también se cumplió otra especificación, la desviación estándar con un resultado de 0.13, que cumple con lo especificado que debe ser menor a 0.365.

Para las pruebas realizadas de Spike (con endotoxina) y Unspike (sin endotoxina) para la Boldenona, se calculó la máxima dilución válida $1/1800$ así que se realizaron diluciones seriadas desde el producto puro sin diluir hasta $1/1800$, según los resultados obtenidos en los ensayos por duplicado de Unspike se pudo determinar que el producto no presenta contaminación por endotoxinas, ni realce de la reacción en ninguna dilución; y en cuanto al Spike se pudo observar que el producto no presenta ninguna inhibición ni interferencia que afecte la prueba de LAL debido a que se presentaron positivos desde el producto sin diluir, hasta la máxima dilución válida, de esta forma se eligió la dilución de trabajo $1/1000$. Una vez elegida la dilución de trabajo, se realizó la validación del producto con tres lotes diferentes donde se pudo constatar que se puede detectar la presencia de endotoxinas de acuerdo con la sensibilidad del reactivo de LAL (0.25λ), ya que no se presentaron diferencias significativas entre los resultados estadísticos obtenidos y las especificaciones de media geométrica y desviación estándar. (Tabla No. 14).

En cuanto al Calmadex (Tabla No. 24), también se determinó la ausencia de endotoxinas en el producto ya que no se apreció formación del gel desde el producto sin diluir hasta la máxima dilución válida $1/6000$, y en el Spike se presentó interferencia hasta la dilución $1/32$, probablemente porque el producto contiene iones de calcio, magnesio y fósforo que pueden generar interferencia hasta esta dilución, lo que nos muestra que se debe utilizar una mayor dilución para realizar la prueba y superar estas interferencias, así que se escogió como dilución de trabajo $1/2000$. Para el Vitavecol A (Tabla No. 19), tampoco se presentaron positivos en el unspike lo que demuestra que el producto no está contaminado por

endotoxinas bacterianas y en el Spike se presentó interferencia del producto sin diluir hasta la dilución $1/512$, debido a la naturaleza oleosa del producto, por éste motivo se escogió como dilución de trabajo, la dilución $1/8000$.

En el ensayo de validación final se verificó la sensibilidad del reactivo de LAL en presencia de la dilución de trabajo. Se realizaron las validaciones de los tres productos con tres lotes diferentes, donde tampoco se encontraron diferencias significativas de los resultados estadísticos con las especificaciones dadas por la USP.

Considerando que los controles negativos para todas las pruebas fueron siempre negativos se descarta de ésta forma alguna contaminación por parte del material o del agua para inyección utilizada que pudiera dar un falso positivo.

Según las características analíticas de este método se pudieron determinar parámetros como la precisión, ya que las desviaciones estándar se encontraron dentro del límite establecido, demostrando el grado de concordancia entre los diferentes resultados obtenidos; el límite de detección debido a que se utilizó la sensibilidad de LAL de 0.25 UE/mL; repetibilidad porque se realizaron varias réplicas y se manejaron tres lotes diferentes de producto; y finalmente reproducibilidad porque los ensayos se realizaron por analistas diferentes en tiempos diferentes.

Fue de vital importancia que todo el material utilizado como pipetas y tubos en la validación de los tres productos fueran sometidos a un correcto ciclo de despirogenización en hornos previamente validados.

8. CONCLUSIONES

- Se validó la prueba de esterilidad por el método de filtración por membrana para Ivermectina, Vitavecol A y Calmadex demostrando que funciona de manera adecuada frente a una posible contaminación microbiana.
- Se verificó que tres lavados con el diluyente apropiado son suficientes para asegurar que la actividad bacteriostática y fungistática propia de cada uno de los productos no interfiere con la veracidad de la prueba de esterilidad.
- El método de filtración por membrana demostró ser muy sensible ya que en alto contenido de volumen de los productos puede ser evaluado permitiendo detectar pequeñas cantidades de contaminantes.
- Las pruebas de promoción de crecimiento aseguran que los medios de cultivo utilizados son idóneos para el crecimiento de los microorganismos empleados en la prueba.
- Los recuentos realizados en la pruebas de esterilidad aunque no son de carácter obligatorio le otorgan solidez a la validación realizada.
- La selección adecuada de la sensibilidad del reactivo del LAL según el límite de endotoxinas de los productos a evaluar y confirmada en el ensayo del rótulo y en la validación del operario permite obtener resultados confiables.
- Las pruebas preliminares Spike y Unspike realizadas en la validación de la prueba de LAL son fundamentales para demostrar

que los productos no inhiben ni potencian la reacción, ni interfieren con el ensayo, además de ser indispensables para escoger la dilución de trabajo.

- Con la dilución de trabajo se realizó la prueba final en donde se validaron los productos Boldenona, Calmadex y Vitavecol A.
- Se pudo establecer mediante los resultados obtenidos que la prueba de LAL cumple con parámetros analíticos como los son la especificidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección y solidez.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la validación de todos los productos de la empresa VECOL S.A para las pruebas de esterilidad y endotoxinas bacterianas.
- Realizar una nueva validación si hay algún cambio en el procedimiento de las pruebas, cambio de analista o de proveedor.
- Tener un adecuado control de los prerrequisitos de validación con relación a la prueba de bacteriostasis y fungistasis como lo son: Pruebas de esterilidad de medios de cultivo, promoción de crecimiento, control de ambientes y superficies; para esta forma dar un soporte a la validación.

10.REFERENCIAS

- Adams, R., 2001. Farmacología y terapéutica veterinaria. Segunda edición Ed Acribia. Zaragoza España. Pág.2040.
- Agudelo, C. M. 1999. Valoración de endotoxinas bacterianas en sueros antiofídicos de origen equino. Optimización de métodos en el control de calidad. *Tesis magíster*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Postgrado Microbiología. Bogotá.
- Aguirre, C. 2002. Promoción y crecimiento en medios de cultivo. VECOL S.A. PRO-CC1-056.
- Aguirre, C. 2004. Protocolo de validación técnica de análisis endotoxinas bacterianas LAL. VECOL S.A. PRO-GC1-007.
- Aguirre, C. 2004. Prueba de esterilidad. VECOL S.A. PRO-CC1-002.
- Akers, M., Larrimore, D., Guazzo, D. 2003. Parenteral Quality Control Volume 125. Marcel Dekker, Inc. New York. CAPITULO 1 Y 2
- Arias, J. 2005. Manual Microbiología Farmacéutica. Editorial Ceja.
- Associates of Cape Code Inc. 1997. Pruebas Preliminaries. Volumen 14 N° 1.
- Associates of Cape Code Inc. 1997. Pruebas Rutinarias y Repruebas. Volumen 15 N° 2.

- Associates of Cape Code Inc. 1997. Selection of standard. Volumen 17 N° 1.
- Barajas, E., 2004. Validación del método de filtración por membrana como prueba de esterilidad para dos productos farmacéuticos Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá.
- Cooper. J.F. 1999. J. Validation of Bacterial Endotoxins Test Methods. Volumen 6 N° 2
- Goodman, L., Gilman, A.1981. Bases farmacológicas de la terapéutica. Tercera Edición Unión tipográfica editorial hispano americana. Buenos Aires.
- Hernández, H., 2003 Validación de la prueba de endotoxinas bacterianas por la técnica de LAL (Lisado de *Amebocitos* de *Limulus*) en dos productos farmacéuticos. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá.
- Merck. 2000. Manual de Medios de cultivo.
- Neira, D. 2004. Protocolo de validación técnica de esterilidad. VECOL S.A. PRO-GC1-044.
- Neira, D. 2004. Validación de Bacteriostasis y Fungistasis. VECOL S.A. PRO-CC1-055.
- Organización Mundial de la Salud. 1998. Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de la fabricación (PAF)

Segunda parte: Validación.

- Prior. R. 1990. Clinical application of the *Limulus* Amebocyte lysate test. CRC Press. Florida. USA.
- Remington. 2003. Farmacia. 20^a Edición. Ed Médica Panamericana. Tomo 1
- Sumano, H., Ocampo I. 2001 Farmacología veterinaria. Segunda edición. Mc Graw Hill Interamericana México D.F. Capítulo 20.
- The Unites States. 2003 USP XXVII. United States Pharmacopeia. Convetion .Inc USA.
- The Unites States. 2006 USP XXIX. United States Pharmacopeia. Convetion .Inc USA.
- Vademécum, Vecol S.A. 2005
- Vademécum, Vecol S.A. 2006
- Werner, J. 1998. Inhibition and Enhancement Revisited. Volumen 6 N° 4.
- Who Expert Committee en specifications for Pharmaceutical Preparations. Reporte 32. Génova World Health Organization (WHO Technical Report Series, No. 823,1992)

11. ANEXOS

ANEXO 1

VALIDACIÓN PRUEBA DE ESTERILIDAD

1. Prueba de esterilidad de Medios de Cultivo:

- Incubar por duplicado 40ml cada uno de los medios de cultivo (Tioglicolato y Tripticasa) utilizados para la validación, dos a 37°C para mesófilos y dos a 22 °C para hongos y levaduras durante 14 días.
- Observar resultados, siendo la prueba positiva si presenta turbidez y negativa cuando no se evidencia crecimiento, y registrar en el libro: Esterilidades producto en proceso, formato FVC-CC1-576.

2. Prueba de esterilidad de los diluyentes A y D

- Antes de utilizar los diluyentes A y D para la prueba de Bacteriostasis y Fungistasis tomar 4 ml y sembrar en 40 ml de caldo Casoy para hongos y levaduras, llevar a incubar 22°C durante 14 días, repetir este procedimiento con caldo tioglicolato pero llevando a incubar a 37°C; sembrar por goteo los diluyentes en agar sangre, llevar a incubar a 37°C durante 14 días.
- Registrar resultados en el libro “Esterilidades producto en proceso”, formato FVC-CC1-576, siendo la prueba positiva cuando hay crecimiento bacteriano y negativa la ausencia de este.

3. Muestreo de Productos

- Tomar del inicio, mitad y final del envase 30 frascos de Ivermectina 1% x 250 ml, 15 de Calmadex x 500 ml y 30 frascos de Vitavecol A x 250 ml. Se analizaron 10 replicas de un mismo lote de cada producto.

ANEXO 2

PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO

- A partir de cepas de los microorganismos utilizados *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, realizar una siembra por agotamiento de los mismos en agar sangre, para recuperarlos en fase logarítmica (18-24horas), incubar a temperatura y ambiente adecuados, referenciados en la Tabla No.2.
- Preparar una suspensión de estos microorganismos en Solución salina fisiológica al 0.85% (10ml) para cada uno de ellos, utilizando el tubo 3 de Mc-Farland que contiene 9×10^8 UFC/ml.
- Hacer diluciones hasta 10^6 de la siguiente forma:
 - a. Dilución 10^1 : Tomar 1 ml de la suspensión pura en Solución salina fisiológica al 0.85% + 9 ml de Solución salina fisiológica al 0.85%
 - b. Dilución 10^3 : Tomar 0.1 ml de la dilución 10^1 + 9.9 ml de Solución salina fisiológica al 0.85%
 - c. Dilución 10^5 : Tomar 0.1 ml de la dilución 10^3 + 9.9 ml de Solución salina fisiológica al 0.85%
 - d. Dilución 10^6 : Tomar 1 ml de la dilución 10^5 + 9 ml de Solución salina fisiológica al 0.85%, donde se tendrá una concentración final de 9×10^6 UFC/ml (0.1 ml contienen 90 UFC).
- De la dilución anterior tomar 0.1ml y sembrar en los medios Tioglicolato y Trypticasa y llevar a incubar como se indica en la Tabla No.2.
- Observar los medios durante 5 días, siendo la prueba positiva si presenta turbidez y negativa cuando no se evidencia crecimiento, registrar en el formato Resultados Promoción de crecimiento FVC-CC1-455.

ANEXO 3

VALIDACIÓN DE BACTERIOSTASIS Y FUNGISTASIS

- Preparar una suspensión de los microorganismos citados en la Tabla No. 2, con Solución salina fisiológica al 0.85% (10ml) para cada uno de ellos, utilizando el tubo 3 de Mc-Farland como patrón, el cual contiene 9×10^8 UFC/ml.
- Hacer diluciones hasta 10^6 de la siguiente forma:
 - a. Dilución 10^1 : Tomar 1 ml de la suspensión pura Solución salina fisiológica al 0.85% + 9 ml de Solución salina fisiológica al 0.85%
 - b. Dilución 10^3 : Tomar 0.1 ml de la dilución 10^1 + 9.9 ml de Solución salina fisiológica al 0.85%
 - c. Dilución 10^5 : Tomar 0.1 ml de la dilución 10^3 + 9.9 ml de Solución salina fisiológica al 0.85%
 - d. Dilución 10^6 : Tomar 1 ml de la dilución 10^5 + 9 ml de Solución salina fisiológica al 0.85%, donde se tendrá una concentración final de 9×10^6 UFC/ml (0.1 ml contienen 90 UFC).
- Con ayuda de un sistema de filtración, utilizando membranas adecuadas para cada producto, $0.45 \mu\text{m}$ para Calmadex, $0.45 \mu\text{m}$ para Ivermectina y $0.20 \mu\text{m}$ para Vitavecol A; filtrar 100ml del producto.
- Lavar dos veces la membrana de filtración con 100 ml del diluyente apropiado: Vitavecol A e Ivermectina con diluyente D y Calmadex con diluyente A.
- Hacer un tercer lavado con 100ml de diluyente (A o D según el producto) que contenga 0.1 ml de la dilución 10^6 de la suspensión del microorganismo a evaluar.
- En condiciones de asepsia retirar la membrana del equipo de filtración con las pinzas sembrarla en el medio adecuado

(Tioglicolato o Tripticasa Soya) para cada microorganismo, llevar a incubar durante 7 días como se indica en la Tabla No. 2.

- Realizar un control positivo del diluyente de la siguiente forma: en otra membrana de filtración que no haya sido expuesta al producto evaluado, repetir el proceso de filtración para el diluyente con 2 lavados con diluyente puro y un lavado con el diluyente que contiene 0.1 ml del microorganismo.
- Llevar a incubar durante 7 días a la temperatura indicada en la Tabla No. 2 según el microorganismo.
- Se observa por inspección visual los medios de cultivo, determinando la similitud o diferencia de turbidez que se presente entre la muestra y el control positivo
- Si la turbidez es similar tanto en el control positivo como en la muestra se concluye que el volumen y número de lavados ya establecidos son los correctos para realizar la prueba. Registrar los resultados en el formato: Resultados de Bacteriostasis y Fungistasis, FVC-CC1-397.

ANEXO 4

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

CONDICIONES GENERALES

- Todo material que tenga contacto utilizado para la ejecución de la prueba debe ser apirógeno.
- La muestra a analizar debe tener un pH entre 6.0-8.0, de lo contrario ajustar con HCl o NaOH.
- Obtener el certificado de análisis de endotoxina Vs Pyrotell.

1. Preparación reactivo de LAL

- Con ayuda de una pipeta apirógena adicionar 5 mL de agua reactivo LAL o agua estéril para inyección al reactivo liofilizado de LAL (Pyrotell) de sensibilidad 0.25 UE/mL, agitar suavemente 30 segundos, evitando formar espuma.
- Dispensar 100ul del lisado en tubos 10x75 mm estériles libres de pirógenos, evitando tocar la boca de ellos reconstituido ,taparlos con parafilm inmediatamente,
- Almacenar a -20C hasta 1 meses.

2. Preparación de la endotoxina

- Con ayuda de una pipeta apirógena adicione 5 mL de agua de reactivo de LAL o agua estéril para inyección a la endotoxina CES de concentración 5.000 UE/vial. La concentración una vez reconstituida es de 1000 UE/mL.
- Cubrir con papel parafilm.
- Agitar en el Vortex fuertemente durante 1 minuto para mezclar la solución de endotoxina en forma completa, dejar en reposo 30

minutos; luego 3 periodos de agitación de un minuto con intervalos de 9 minutos de reposo entre cada minuto de agitación.

- Almacenar a 4°C durante 4 semanas.
- Debe ser agitado en el vortex 1 minuto cada vez que se utilice nuevamente.

ANEXO 5

VALIDACIÓN DEL ROTULO DEL REACTIVO LAL Y DEL OPERARIO-ANALISTA

Este ensayo consiste en evaluar diferentes concentraciones de endotoxina CSE al reactivo de LAL, 4 veces por concentración, cada vez que se inicie un vial de pyrotell y de endotoxina, o dos veces por dilución en el caso de trabajo de rutina.

1. Diluciones

Realizar diluciones de endotoxina a partir de la solución madre de concentración 1000 UE/mL de la siguiente manera:

Dilución A: Con una concentración de 10 UE/mL = 40 λ : Hacer dilución 1:100: 100ul de solución madre (1000UE/mL)+9.9 ml agua de reactivo de LAL o agua para inyección estéril.

Dilución B: Con una concentración de 1.0 UE/mL = 4 λ : Hacer dilución 1:10: 1 ml de la dilución A +9 ml agua de reactivo de LAL o agua para inyección estéril.

Dilución C: Con una concentración de 0.5 UE/mL = 2 λ : Hacer dilución 1:2: 1 ml de la dilución B +1 ml agua de reactivo de LAL o agua para inyección estéril.

Dilución D: Con una concentración de 0.25 UE/mL = 1 λ : Hacer dilución 1:2: 1 ml de la dilución C +1 ml agua de reactivo de LAL o agua para inyección estéril.

Dilución E: Con una concentración de 0.125 UE/mL = 0.5λ: Hacer dilución 1:2: 1 ml de la dilución D +1 ml agua de reactivo de LAL o agua para inyección estéril.

Dilución F con una concentración de 0.06 UE/mL = 0.25λ: Hacer dilución 1:2: 1 ml de la dilución E +1 ml agua de reactivo de LAL o agua para inyección estéril.

Colocar en una gradilla para tubos de 10x75mm 4 filas o 2 filas (4 inicio de vial o 2 trabajo de rutina), cada una de 6 tubos y marcar de izquierda a derecha así: 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 y C-.

2. Adición de la endotoxina

Con ayuda de la micropipeta cambiando de una punta entre cada dilución adicione 100ul de endotoxina de concentración 1.0UE(B), 0.5UE(C), 0.25UE(D), 0.125UE(E), 0.06EU(F), a cada tubo, los tubos marcados C-control adicione 100ul de agua apirógena.

3. Adición de reactivo de LAL.

Dispensar 100ul de reactivo LAL sensibilidad 0.25 UE/ml en todos los tubos y agitar la gradilla.

Incubar 37+/- 1C durante 60 minutos

Leer tomando cada tubo cuidadosamente 180 angulares.

(+) Formación de gel al invertir 180

(-) Ausencia de gel

4. Cálculos

Una vez realizada la lectura se debe determinar lo siguiente:

Punto final: confirma sensibilidad, y es la última dilución de la serie que da resultado positivo es decir, donde se forma el gel firme.

-Log. 10 del punto final.

-Sumatoria Log.

-Promedio Log.

-Antilog de la media para obtener Media geométrica M.G.

-Desviación estándar.

Se deben cumplir las siguientes condiciones:

-Que la MG este entre $(0.5\lambda - 2\lambda)$, donde λ significa la sensibilidad del LAL.

-Que la desviación estándar sea < 0.365 , que corresponde a un limite superior de confianza 0.99%.

ANEXO 6

CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO

- Consiste en conocer la máxima dilución que se puede hacer a la muestra y aun detectar endotoxinas presentes con el método de LAL.
- Para realizar este cálculo se debe referenciar al límite de endotoxina permitido por la farmacopea oficial, para cada producto.
- Para ello se realiza el siguiente cálculo:

$$\text{Máxima Dilución Valida M.D.V.} = \frac{\text{Limite de endotoxina}}{\text{Sensitividad de LAL } (\lambda)}$$

Si el límite de la endotoxina es expresada en UE/mg o UE/UI, la potencia del producto debe ser incluida en la formula:

$$\text{M.D.V.} = \frac{\text{Limite de endotoxina x concentración}}{\text{Sensitividad de LAL } (\lambda)}$$

Para los productos que no figuran en la farmacopea oficial y no se conoce el límite de endotoxina se debe realizar de la siguiente manera:

$$\text{Limite de la endotoxina: L.E.} = \frac{K}{M}$$

K: Máxima dosis aceptada a administrar sin producir actividad apirógena, constante que equivale 5UE/Kg

M: máxima dosis del producto

ANEXO 7

ENSAYO PRELIMINAR SPIKE & UNSPIKE

UNSPIKE (Por duplicado) muestra diluida en agua apirógena.

- Se deben marcar del 1 – 9 los tubos de ensayo. El tubo No 1 contiene 200 µl de producto puro, del tubo No 2
- Al No 7 colocar 100 µl de agua apirógena, además hacer diluciones seriadas del producto pasando 100 µl al siguiente tubo, descartando los últimos 100 µl del tubo 7. El tubo 8 lleva 100 µl de producto diluido según la máxima dilución válida. El tubo 9 es el control negativo.
- Adicionar a todos los tubos 100 µl de reactivo de LAL. Agitar fuertemente la gradilla, incubar a 37+/-1°C. Durante 60+/- 1 minuto. Leer tomando cada tubo cuidadosamente e invertirlo 180° angulares.

Tabla 28. Ensayo preliminar Unspike

1	2 (1:2)	3 (1:4)	4 (1:8)	5 (1:16)	6 (1:32)	7 (1:64)	8 (1:mdv)	9 C-
200µl producto	100µl Agua apirógen a	100µl Agua apirógen a	100µl Agua apirógen a	100µl Agua apirógen a	100µl Agua apirógen a	100µl Agua apirógen a	100µl Producto diluido	100µl Agua apirógen a
100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL

mdv: Máxima Dilución Válida

SPIKE (Por duplicado) Muestra diluida en endotoxina.

- Se deben marcar del 1 – 9 los tubos de ensayo. El tubo No 1 contiene 190 µl de producto puro más 10 µl de endotoxina 10 UE/mL. . Del tubo No 2 al tubo No 7 colocar 100 µl de endotoxina 0.5 UE/ml µl. Del tubo 1 al 7 hacer diluciones seriadas del producto pasando 100 µl al siguiente tubo, descartando los últimos 100 µl del tubo No 7. El tubo No 8 lleva 190 µl del producto diluido

- según la MDV más 10 µl de endotoxina 10 UE/ml, finalmente se descartan 100 µl. El tubo No 9 es el control negativo, por ello lleva 100 µl de agua apirógena.
- Adicionar a todos los tubos 100 µl de reactivo de LAL. Agitar fuertemente la gradilla, incubar 37+/- 1°C durante 1 hora.

Tabla 29. Ensayo preliminar Spike

1	2 (1:2)	3 (1:4)	4 (1:8)	5 (1:16)	6 (1:32)	7 (1:64)	8 (1:dt)	9 C-
190µl Producto + 10µl Endo 10UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	190µl Producto diluido + 10µl Endo 10UE/ml	100µl Agua apirógen a
100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL

dt: Dilución de trabajo

ANEXO 8

ENSAYO DEL RÓTULO DEL PRODUCTO

Este ensayo consiste en evaluar diferentes concentraciones de endotoxina CSE frente al reactivo de LAL, 4 veces por concentración, con la dilución de trabajo elegida para el producto.

Una vez realizados los ensayos Spike y Unspike, se hace rótulo del producto con la dilución de trabajo elegida y diferentes concentraciones de endotoxinas. Este ensayo se hace por cuadruplicado.

Para realizar esta prueba se necesita tener una concentración de 2 UE/mL, para obtenerla se realiza primero una dilución 1:2 con 100 µl de la endotoxina pura más 100 µl de agua (500 UE/mL), a partir de esta se realiza una dilución 1:25 tomando 10 µl de la concentración (500 UE/mL) más 240 µl de agua (20 UE/mL), luego se realiza una dilución 1:10 con 60 µl de la concentración (20 UE/mL) mas 540 µl de la dilución de trabajo para obtener finalmente la concentración de 2 UE/mL.

Colocar en una gradilla 4 filas cada una de 6 tubos 10 x 77 mm y marcar 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 y C- (Control negativo). Adicionar a todos los tubos (a excepción del control negativo que lleva 100 µl de agua apirógena) 100 µl del producto diluido según la dilución de trabajo y al tubo No. 1 100 µl de la endotoxina 2 UE/mL, a partir de esta realizar diluciones seriadas tomando 100 µl de la dilución anterior y finalmente descartar del tubo 0.06 100 µl.

Tabla 30. Procedimiento para el ensayo del rótulo del producto

1	0.5	0.25	0.125	0.06	C-
100 µl del producto diluido(dt)+ 100µl Endo 2UE/ml	100 µl del producto diluido(dt)+ 100µl Endo 1 UE/ml	100 µl del producto diluido(dt)+ 100µl Endo 0.5 UE/ml	100 µl del producto diluido(dt)+ 100µl Endo 0.25UE/ml	100 µl del producto diluido(dt)+ 100µl Endo 0.125UE/ml	100 µl de agua apirógena
100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL

Agitar fuertemente la gradilla, incubar a 37+/-1°C durante 60+/- 1 minuto.
Leer tomando cada tubo cuidadosamente e invertirlo 180° angulares.

Se debe repetir este ensayo de rótulo con 3 lotes diferentes del producto para su validación, una vez validado se podrá ejecutar el ensayo de rutina.

ANEXO 9

ENSAYO DE RUTINA

Una vez realizados los ensayos anteriores la muestra se analiza por duplicado a la dilución que fue estandarizada en el ensayo preliminar.

Colocar 6 tubos que contengan 100 µl de reactivo de LAL (pyrotell) debidamente marcados, 2 tubos con el nombre de la muestra, 2 como control positivo y dos como control negativo en la gradilla. En el tubo de muestra se ponen 100 µl de producto diluido según la dilución de trabajo, en los tubos control positivo se ponen 100 µl del producto diluido más 10 µl de la endotoxina 10 UE/ml y en los tubos de control negativo 100 µl de agua apirógena.

Tabla 31. Ensayo de rutina

MUESTRA	CONTROL +	CONTROL -
100 µl de producto diluido.	100 µl de producto diluido + 10 µl de endotoxina 10UE/ml	100 µl de agua apirógena
100 µl LAL	100 µl LAL	100 µl LAL

Agitar fuertemente la gradilla, incubar a 37+/-1°C durante 60+/- 1 minuto. Leer tomando cada tubo cuidadosamente e invertirlo 180° angulares.

Interpretación de resultados

El resultado positivo es aquel que forma una gelificación firme demostrable con la inversión del tubo 180° angulares.

El resultado negativo es aquel que no forma gelificación o que esta tan débil que no se mantiene cuando el tubo se invierte cuidadosamente 180° angulares.

Para que el resultado de la muestra analizada sea satisfactorio debe dar negativo a la dilución de trabajo en la que fue estandarizada o muestra contener una concentración de endotoxina menor que el límite.

Todos los resultados de la validación de LAL deben registrarse en el formato, Resultados análisis endotoxinas LAL producto inyectable FVC-CC1-359.