

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**VALIDACION DE LA PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA (LAL) POR
EL METODO GEL – CLOT UTILIZANDO EL PRODUCTO FUROSEMIDA
(20 mg) INYECTABLE.**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
CLAUDIA BEATRIZ OSORIO COLINDRES**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA**

OCTUBRE, 2011

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LÓPEZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

**ASESORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS, COSMETICOS Y VETERINARIOS**

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS, MICROBIOLOGICO

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

DOCENTE DIRECTORA

MSc. Norma Esthela Molina Velásquez

AGRADECIMIENTOS

A Dios sobre todas las cosas por darme sabiduría y paciencia; guiarme a través de toda mi carrera y permitirme llegar al culmen de ella.

A mi familia que siempre ha sido mi motivo de superación, gracias por sus consejos y oraciones; pero en especial agradezco todo el apoyo que incondicionalmente he recibido de mi madre, quien me ha enseñado a seguir adelante a pesar de las dificultades.

Al comité de Trabajo de Graduación Lic. Maria Odette Rauda, Licda. Zenia Ivonne de Márquez, MSc. Amy Elieth Morán Rodriguez y a mi docente directora MSc. Norma Esthela Molina guiarme en este proceso de investigación, por sus observaciones y recomendaciones tan acertadas para el desarrollo de este trabajo.

A todos mis amigos que siempre han estado conmigo apoyándome y brindándome su ayuda de manera incondicional.

AL laboratorio nacional que me permitió desarrollar este proceso y me brindo su plena colaboración, también a las compañeras de trabajo que dieron todo su empeño para el desarrollo del proceso de validación.

Y a todas las personas que de una u otra manera han colaborado para que este trabajo llegara a su término. MUCHAS GRACIAS

DEDICATORIA

A Dios por haberme llenado de gracia y sabiduría para culminar con éxito mi carrera, por bendecirme con las personas que ha puesto en mi camino, que me ayudaron desde el inicio de mi carrera y por bendecirme con una grandiosa madre.

A mi madre María Colindres quien con todo su empeño, amor y valentía me ha sacado adelante y por quien en mi vida este triunfo ha sido posible.

A mi familia por llevarme siempre en sus oraciones, por darme su apoyo y sus consejos en todo momento, por creer en mí y brindarme tanto cariño.

A todas las personas que quiero: mis amigos y compañeros, todos los que estuvieron y estarán a mi lado; sepan que aunque no realice mención específica en mi corazón está grabado su nombre, gracias por su apoyo, por todo el cariño brindado y su amistad.

Claudia Osorio

INDICE

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xx
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
2.1 Objetivo General	
2.2 Objetivos específicos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	26
3.1 Inyectables	26
3.1.1 Producción de productos inyectables	26
3.1.2 Calidad de los productos farmacéuticos	29
3.1.3 Control microbiológico en la producción inyectable	30
3.1.4 Control de calidad de producto terminado	35
3.2 Furosemida inyección	38
3.2.1 Monografía oficial USP 32	38
3.2.2 Información farmacológica	42
3.2.2.1 Forma farmacéutica	42
3.2.2.2 Datos clínicos	42
3.2.2.3 Posología y forma de administración	42
3.2.2.4 Propiedades farmacológicas	43
3.2.2.5 Propiedades farmacocinéticas	44

3.2.2.6	Contraindicaciones	44
3.2.2.7	Advertencias	45
3.2.2.8	Embarazo y lactancia	48
3.2.2.9	Reacciones adversas	49
3.3	Toxinas bacterianas	50
3.3.1	Componentes de la cubierta celular bacteriana	51
3.3.2	Pirógenos: endotoxinas bacterianas	53
3.3.2.1	Regiones de las endotoxinas bacterianas	54
3.3.2.2	Mecanismo de la fiebre	57
3.4	Prueba de endotoxinas bacterianas	58
3.4.1	Historia	59
3.4.2	Principios biológicos	61
3.4.3	Bioquímica LAL – Endotoxina: reacción de coagulación.	62
3.4.4	Métodos del LAL	64
3.4.5	Estándar de endotoxinas	69
3.4.5.1	Estándar primario	69
3.4.5.2	Estándares secundarios	69
3.4.6	Límite de endotoxinas	70
3.5	validación de métodos analíticos	71
3.5.1	Tipos de validación	76
3.5.2	Características analíticas usadas en la validación de métodos	76
3.5.3	Documentación de validación	80
3.5.3.1	Plan Maestro de Validación	80
3.5.3.2	Protocolo de validación	82
3.5.3.3	Informe y certificado de validación	83

4.4.7 Elaboración del informe de validación	99
4.4.8 Certificado de validación.	99

Capitulo V

5.0 Resultados

5.1 Desarrollo del protocolo de validación para la prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel - Clot del producto Furosemida (20mg) inyectable.	102
5.2 Realización de los ensayos de sensibilidad, inhibición / realce y prueba límite bajo la metodología oficial de la USP 32 y los lineamientos de validación del método dados por la FDA en las instalaciones de un Laboratorio nacional certificado.	151
5.3 Interpretación y análisis de los resultados obtenidos para validar la prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel – Clot para el producto Furosemida (20 mg) inyectable.	165
5.4 Elaboración el informe y certificado de validación como documentación final que certifique el proceso de validación del método LAL para el producto Furosemida (20 mg) inyectable.	174
5.5 Entrega tres recopilaciones del proceso de validación ejecutado a las cátedras de Control de Calidad de productos farmacéuticos y veterinarios I y Microbiología Aplicada III respectivamente para que contribuya a la	186

formación académica de los estudiantes de la facultad de Química y Farmacia en el tema de validación de métodos analíticos microbiológico.

Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	188
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	191
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Esquema de manufactura de productos inyectables.
2. Guía de validación de la prueba de lisado de amebocitos de Limulus como la prueba de endotoxinas de productos terminados para uso parenteral en humanos y animales, productos biológicos y dispositivos médicos; de la FDA.
3. Apartado 85, "Prueba de Endotoxinas bacterianas" de la Farmacopea de los Estados Unidos, edición 32 (USP 32).
4. Formatos de cuadros de recolección de datos.
5. Cascadas de diluciones del control estándar de endotoxinas.
6. Certificado de compilación de Control Estándar de Endotoxina.
7. Certificado de compilación de Agua grado reactivo LAL.
8. Certificado de compilación de Lisado de amebocitos de Limulus Pyrotel®.
9. Certificado de estandarización de Control Estándar de Endotoxina frente al Estándar de Referencia de Endotoxina Pyrotel®.
10. Cartas de entrega de manual de procedimiento de validación de la prueba de endotoxina bacteriana (LAL) por el método Gel - Clot.

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro N°	
1. Características, requisitos y verificación de requisitos de área de validación.	104
2. Requisitos y verificación de equipos e instrumentos implicados en la realización de los ensayos.	107
3. Recolección de datos para prueba de confirmación de sensibilidad.	119
4. Recolección de datos para prueba de interferencias.	119
5. Recolección de datos para prueba del límite de coagulación de la dilución de trabajo.	120

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura N°	
1. Formula estructural de Furosemida	38
2. Pared celular de una bacteria Gramnegativa.	52
3. Liberación de endotoxinas bacterianas.	56
4. Cangrejo herradura (<i>Limulus polyphemus</i>)	59
5. Representación de la cascada de reacción que experimenta el reactivo LAL en presencia de endotoxinas- modelo Lennin 1979.	62
6. Cascada de coagulación de las endotoxinas frente al reactivo LAL.	63
7. Metodología general del sistema de validación.	85
8. Área de análisis de esterilidad del Laboratorio nacional certificado.	103
9. Grafico de medición diaria de temperatura y humedad relativa en área de análisis de validación.	105
10. Equipo muestreador de aire MAS 100 NT	106
11. Grafico de medición diaria de temperatura de baño María.	108

12. Tabla de preparación de soluciones para prueba de interferencias, tomado de apartado general <85>. USP 32	114
13. Procedimiento general de preparación de tubos para ensayos.	115
14. Esquema de interpretación de resultados.	116
15. Tabla de preparación de soluciones para prueba de límite de coagulación, tomado de apartado general <85>. USP 32.	177
16. Esquema de verificación de sensibilidad de reactivo LAL.	154
17. Ampollas de Furosemida PL.	156
18. Esquema de pruebas de factores de interferencia.	161
19. Esquema de prueba de límite de coagulación de muestra.	164
20. Esquema de manufactura de productos inyectables	199

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N°	
1. Clasificación de ambientes por tamaño de partículas.	31
2. Parametros requeridos para validación según USP 32.	78
3. Resultados de medición de pH obtenidos de lotes de Furosemida PL ensayados.	160
4. Resultados de confirmación de sensibilidad de reactivo LAL.	165
5. Resultados de prueba de interferencias, analista: Claudia Osorio.	168
6. Resultados de prueba de interferencias, Analista 2.	169
7. Resultados de prueba de interferencias, Analista 3.	170
8. Resultados de análisis de validación Furosemida PL, Lote: E011G10.	175

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- **BPM:** Buenas Prácticas de Manufactura.
- **CSE o CEE:** Control estándar de endotoxina.
- **Endotoxina:** endotoxina bacteriana.
- **FDA:** Administración de drogas y alimentos.
- **GM:** media geométrica o promedio geométrico.
- **IL-1:** interleucina 1.
- **IL-8:** interleucina 8.
- **ISO:** Organización Internacional de Estandarización.
- **LAL:** Lisado de Amebocitos de *Limulus polyphemus*.
- **Limulus:** *Limulus Polyphemus*.
- **LPS:** lipopolisacárido.
- **MAC:** macrófago.
- **MDV:** máxima dilución válida.
- **PG-E2:** prostaglandina E2.
- **PH:** potencial de Hidrogeno.
- **PMV:** plan maestro de validación.
- **POE:** procedimiento de operación estándar.
- **RSE/ EER:** Estándar de Referencia de Endotoxina.
- **SGC:** sistema de gestión de calidad.
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa.
- **UE:** Unidades de Endotoxina.
- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonia.
- **USP:** Farmacopea de los Estados Unidos.
- λ : Sensibilidad del reactivo LAL en UE/mL.

RESUMEN

La presente investigación tuvo por objeto la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas por el método gel – clot utilizando el producto Furosemida (20 mg) solución inyectable.

La muestra fue puntual ya que se trabajó con muestras producidas por un laboratorio nacional certificado, se utilizaron los lineamientos de la Guía de Validación de dicho método referidos por la FDA y la metodología oficial de la prueba de endotoxinas bacterianas dada por la Farmacopea de los Estados Unidos, edición 32; los ensayos fueron realizados en las instalaciones de dicho laboratorio nacional.

Se elaboró el protocolo de validación, documento que incluyó responsabilidades, método, instrumentos, criterios de aceptación, recolección de datos y manejo de cálculos, necesarios para el desarrollo de los ensayos.

Además se realizaron ensayos de verificación de sensibilidad del reactivo LAL a emplear durante todo el proceso de validación, realizados por cada uno de tres analistas empleando un solo lote de Control Estándar de Endotoxina y Reactivo LAL de compatibilidad demostrada.

Se realizó también la prueba de factores de interferencia con tres lotes diferentes de producto ejecutando tres ensayos por lote: uno por cada analista. Comprobándose que las muestras analizadas no presentan ningún factor que pueda inducir o bien inhibir la formación de los coágulos si hubiese o no presencia de endotoxinas en la muestra.

Posterior a esto se les realizó la prueba de límite de coagulación con la que se determino que las muestras no presentan más de 0.125 unidades endotoxinas bacterianas por mL de Furosemida.

Además se elaboró un informe y certificado de validación en el que se plasmó según los resultados obtenidos que la metodología empleada queda validada, por lo que se recomienda la aplicación de procesos de validación de métodos

dentro de la industria farmacéutica y como parte de la formación estudiantil de la facultas de Química y Farmacia.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

En la industria de medicamentos parenterales el control de materia prima, materiales y equipos, utilizados en la producción de medicamentos inyectables es de gran importancia ya que estos deben estar libres de microorganismos, especialmente de las bacterias Gramnegativas que liberan como producto de su metabolismo las endotoxinas, responsables de producir una respuesta febril en el organismo y en algunos casos pudiendo causar la muerte cuando son administrados por vía intravenosa, convirtiéndose en un peligro para el hombre.⁽¹⁾

La determinación de endotoxinas por medio del método Gel Clot en el cual se utiliza el lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL) (derivadas del lipopolisacárido LPS de las bacterias Gramnegativas), está basado en la aglutinación de extractos de amebocito de sangre de *Limulus Polyphemus*. Principal ensayo en el control de calidad de la fabricación de inyectables, el cual requiere la aplicación de una técnica estandarizada para el análisis de los dichos productos.

Por lo que en el presente trabajo de graduación se desarrolló la validación del ensayo de Endotoxinas bacterianas por el método de gel - clot utilizando inyectables de Furosemida (20 mg) en las instalaciones de un laboratorio nacional certificado, utilizando la metodología analítica que provee la farmacopea de los estados unidos en su edición 32 ya que establece los

parámetros que todo laboratorio productor de medicamentos utiliza para asegurar que sus productos sean de calidad, además de incluir los parámetros de validación referidos por la FDA para dicha prueba en su guía de validación.

Una de las maneras de lograr la calidad es contar con metodologías validadas; de manera que se demostró que los procedimientos analíticos utilizados en dicho laboratorio son aptos para el uso indicado a través de la realización de los ensayos de verificación de la sensibilidad del reactivo empleado, la prueba de factores de interferencia y la prueba de límite de coagulación como parámetros de validación.

De esta manera la aplicación de metodologías validadas es de gran importancia en los laboratorios farmacéuticos durante la elaboración de productos inyectables por la rigurosidad que implica su producción y aun más por los resultados terapéuticos posteriores a su administración.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Validar la prueba de endotoxina bacteriana (LAL) por el método Gel-Clot utilizando el producto Furosemida (20 mg) inyectable.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Desarrollar el protocolo de validación para la prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel – Clot del producto Furosemida (20mg) inyectable.

2.2.2 Realizar los ensayos sensibilidad, inhibición / realce y prueba límite bajo la metodología oficial de la USP 32 y los lineamientos de validación del método dados por la FDA en las instalaciones un laboratorio nacional certificado.

2.2.3 Interpretar y analizar los resultados obtenidos para validar la prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel – Clot para el producto Furosemida (20 mg) inyectable.

2.2.4 Elaborar el informe y certificado de validación documentación final que certifique el proceso de validación del método LAL para el producto Furosemida (20 mg) inyectable.

2.2.5 Entregar tres recopilaciones del proceso de validación ejecutado a las cátedras de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos (humanos y veterinarios) I y Microbiología Aplicada III

respectivamente para que contribuya a la formación académica de los estudiantes de la facultad de Química y Farmacia en el tema de validación de métodos analíticos microbiológico.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 INYECTABLES

El término parenteral hace referencia a la vía de administración de los fármacos. Atravesando una o más capas de la piel o de las membranas mucosas usando la gravedad o la fuerza mediante una inyección. La vía parenteral es diariamente empleada en atención primaria en multitud de situaciones.

Los artículos parenterales están preparados escrupulosamente por métodos diseñados para asegurar que cumplan los requerimientos farmacopéicos para la esterilidad y pirógenos principalmente, entre otros. Una inyección es una preparación intencionada para la administración parenteral y/o para reconstituir o diluir antes de su administración. (13)

3.1.1 Producción de Productos Inyectables (17)

El proceso de manufactura de productos parenterales de manera general comprende varias etapas, a continuación se presentan y se describen brevemente. (Ver anexo N°1)

- Lavado de ampollas:

Las ampollas abiertas y no estériles se lavan con agua destilada aprobada por control de calidad, a temperatura de 50 a 70° C que pasan por un filtro de 3 micras. Esto con el fin de eliminar residuos y partículas.

Las ampollas limpias se trasladan al horno de despirogenización en una cabina de flujo laminar de transporte.

- Esterilización:

Después del lavado, las ampollas se colocan en recipientes de acero inoxidable y se someten a esterilización por calor seco a 250° C por 2 horas en un horno de esclusa que permite el ingreso de las ampollas sin esterilizar por una puerta y el retiro de las mismas una vez esterilizadas por la puerta que da al área de envasado.

- Manufactura:

De forma paralela a las operaciones de lavado y esterilización de las ampollas se fabrica la solución inyectable a granel en un ambiente no estéril (Clase 100, 000) en un tanque, mezclando las materias primas de la formulación: principios activos, agua libre de endotoxinas y excipientes según el procedimiento respectivo.

- Filtración:

Proceso realizado bajo una cabina de flujo laminar (Área Clase 100)

Terminada y analizada la solución a granel, se esteriliza por el método de filtración a través de una membrana de 0.2 micras, que garantiza que todas las bacterias presentes queden retenidas en el filtro. Esta membrana tiene una presión de punto de burbuja de 50 psi.

Antes de la filtración se realiza la prueba del punto de burbuja para asegurar que la membrana se encuentra íntegra. En esta prueba se presuriza el sistema de filtración hasta aproximadamente 40 psi y luego lentamente se incrementa la presión hasta 50 psi observándose una rápida y continua corriente de burbujas cuando alcanza la presión indicada, se debe mantener no menos de 10 segundos y no debe observarse pérdida de presión lo que garantiza que no hayan orificios. Esta prueba se hace al inicio y al final de la filtración para

asegurar que la membrana se mantuvo en las mismas condiciones durante todo el proceso.

- Envasado y Sellado:

Se realiza en el área estéril, se retiran cuidadosamente los recipientes del horno y se colocan en la zona de envasado. Con las ampollas estériles y la solución estéril y se procede a envasar en una máquina en tres fases:

- 1: Inyección de la solución en las ampollas.
- 2: Inyección de nitrógeno en las ampollas.
- 3: Cierre o sellado de las ampollas con calor (llama de gas y oxígeno).

Antes de ingresar al área estéril, el operario debe verificar que la alimentación de gases sea conforme e ingresa con mameluco estéril. El operario debe cumplir pautas de comportamiento que minimicen el riesgo de contaminación dadas por las buenas prácticas de manufactura (BPM). El envasado se lleva a cabo en el área estéril (Área clase 100) y bajo flujo laminar. La temperatura se mantiene en $21^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y la humedad relativa en $45 \pm 5\%$. El aire que ingresa pasa por filtros absolutos con filtro terminal tipo HEPA de 99,97% de eficiencia con retención de partículas de hasta 0,5 micras de diámetro. La renovación del aire del área no es menos de 20 cambios por hora con presión positiva mayor de 0,05 pulgadas de agua.

- Prueba de hermeticidad:

Las ampollas se someten a esta prueba para detectar posibles fugas o defectos de cierre imperceptibles al ojo humano. Se realiza al 100% de las ampollas

envasadas para verificar que el cierre sea hermético. Se emplea azul de metileno al 0,1% en el cual se sumergen las ampollas sometiendo a vacío controlado, para que las ampollas que pudiesen presentar fugas se colorean internamente.

- Inspección de partículas extrañas:

Personal capacitado revisa el total de ampollas separando aquellas que presentan partículas extrañas insolubles, móviles diferentes a burbujas de gas involuntariamente presentes. Esta inspección se realiza en una pantalla que consta de paneles de contraste iluminados: un panel negro mate (sin brillo), otro panel blanco mate y un portalámpara fijo.

El personal del área de revisión de ampollas pasa anualmente por un examen de aptitud visual. Se pueden encontrar defectos como residuos de vidrio, puntos negros, ampollas quemadas, con falla de impresión, pelusas, volumen bajo, falla de cierre, entre otros.

- Empaque:

Las ampollas que pasan la inspección visual son acondicionadas en sus empaques secundarios y son llevados al almacén en calidad de cuarentena hasta su liberación y futura distribución.

3.1.2 Calidad de los productos farmacéuticos.

La calidad de un producto puede definirse como la capacidad del producto para satisfacer las necesidades para las que ha sido creado. El control de calidad es un conjunto de actividades que aseguran que el producto cumple con las

características requeridas en grado aceptable de conformidad con los límites establecidos.

Así la calidad de los productos farmacéuticos está garantizada por la implementación de las buenas prácticas de manufactura durante todo el proceso productivo más que por el análisis del producto terminado. Siendo las BPM el conjunto de normas y procedimientos relacionados entre sí destinados a garantizar que los productos farmacéuticos tengan y mantengan la identidad, pureza, concentración, potencia e inocuidad requeridas durante su periodo de vida útil. (27)

En la Industria farmacéutica, el Área de Control de Calidad se encarga de verificar que el producto cumple con las especificaciones, iniciando su función desde el análisis de las materias primas, sigue durante las etapas de fabricación y finaliza con los controles al producto terminado. Asegura también la calidad de los materiales, reactivos y equipos que intervienen en el proceso analítico llevando en paralelo el control de la documentación.

El control de calidad puede comprender diversas áreas como la de Control Físicoquímico y Control Microbiológico entre otras.

3.1.3 Control Microbiológico en la producción de inyectables:

La calidad microbiológica de todo producto farmacéutico se ve influenciada por el medio ambiente en el que se fabrica y por los materiales utilizados en su fórmula; su carga bacteriana representa la sumatoria de la carga inicial de las materias primas, equipos, ambiente, operadores y envases utilizados en su fabricación.

El control microbiológico debe verificar que cada una de estas variables cumpla las especificaciones, debe confirmar que los procesos se están realizando de acuerdo a lo establecido, así nos da la seguridad de que las condiciones

ambientales y personales son adecuadas, dando como resultado un producto de buena calidad que cumplirá su objetivo.

La manufactura de productos parenterales requiere un control microbiológico estricto que involucra diferentes procesos de los que se mencionan algunos a continuación:

Control Ambiental:

Es la evaluación microbiológica de los ambientes de producción que evalúa el proceso de limpieza y sanitización, así como el correcto comportamiento del personal indicando que el área está bajo control. En algunos casos se realiza diariamente aunque no estén en operatividad como en el caso de las áreas estériles.

La USP 27 acoge la Norma Federal Estándar 209E ⁽¹¹⁾ que indica el diseño y la construcción de ambientes controlados y ambientes limpios basándose en los límites de partículas de tamaño mayor o igual a 0,5 micras. La industria farmacéutica adopta esta norma desde los valores de la clasificación M 3,5 hacia delante según Tabla N°1.

El criterio de número de partículas individuales por volumen de aire es el siguiente:

Clase 100: el conteo de partículas no es mayor de 100/ pie cúbico de aire de un tamaño mayor o igual a 0.5 micras.

Clase 10,000: el conteo de partículas no es mayor de 10,000/ pie cúbico de aire de un tamaño mayor o igual a 0.5 micras y no más de 70 mayores o iguales a 5.0 micras.

Clase 100,000: el conteo de partículas no es mayor de 100,000/ pie cúbico de aire de un tamaño mayor o igual a 0.5 micras y no más de 700 partículas mayores o iguales de 5.0 micras.

Así se define área estéril como el área limpia que cumple con los requisitos de aire clase 100; siendo el área limpia el área en la que puede ser debidamente controlado el número de partículas, gérmenes, humedad y temperatura. (11)

Tabla N° 1: clasificación de ambientes por tamaño de partícula.

Nombre de la clase	Partículas mayores o iguales a 0.5 μm		
	U.S Customary	cm^3	Pie ³
M1	–	10.0	0.283
M1.5	1	35.3	1.00
M2	–	100	2.80
M2.5	10	353	10.00
M3	–	1,000	28.30
M3.5	100	3,530	100
M4	–	10,000	183
M4.5	1000	35,300	1,000
M5	–	100,000	2,830
M5.5	10,000	353,000	10,000
M6	–	1,000,000	28,300
M6.5	100,000	3,530,000	100,000
M7	–	10,000,000	283,000

Adaptado de norma Federal Estándar 209E, septiembre 11, 1992. "Airbone Particulate Cleanliness Clases in Clean Rooms and Clean Zones"

Nota: Se resaltan los valores a los que se adapta la industria farmacéutica.

- Control de Indumentaria:

La principal fuente de contaminación en los ambientes controlados son los operarios y el área de microbiología debe verificar que el personal y su indumentaria estén cumpliendo las especificaciones con muestreos periódicos aleatorios según procedimiento.

El uniforme corresponde a la indumentaria que el personal utiliza en las áreas de trabajo, estos pueden contribuir con partículas viables y no viables en el ambiente. Se evalúan los uniformes del personal que labora en las áreas de manufactura y área estéril (filtración y envasado) con la finalidad de verificar que ofrezcan las condiciones apropiadas de asepsia.

El personal que trabaja en el área estéril debe vestir correctamente un mameluco estéril que no desprenda fibra ni partículas evitando que ingrese contaminación.

- Control de Superficies:

El control de superficies permite evaluar que los equipos e infraestructura de las áreas cumplen con las especificaciones establecidas y minimizan los riesgos de contaminación microbiana por contacto con el producto. La superficie a muestrear es toda zona expuesta que está en contacto o sobre el cual se manipulan los productos farmacéuticos: mesas, equipos, etc. El control se realiza con el hisopado de paredes, pisos, mesas, partes de máquina, ropa, etc. Las áreas de las placas de contacto varían de 24 a 30cm², cuando se hisope, el área muestreada debe ser mayor o igual a 24cm² pero no mayor de 30cm².

- Control de Esterilizaciones:

Todos los materiales, equipos, uniformes, etc. empleados en la fabricación de inyectables deben ser esterilizados antes del uso.

Dicha esterilización puede llevarse a cabo por 2 métodos: por calor húmedo y por calor seco.

- Por calor húmedo; Autoclavado

El autoclavado emplea vapor saturado a presión y temperatura regulada durante un tiempo determinado, suficiente para eliminar los microorganismos y dejar a los productos sometidos a este proceso en calidad de estériles.

El control se realiza empleando un bioindicador para verificar la idoneidad del proceso. El bioindicador es una ampolla conteniendo esporas de *Bacillus stearothermophyllus* ATCC. En un correcto proceso de autoclavado a 121° C x 75 minutos a 1 atmósfera de presión, las esporas experimentan destrucción total, pero a temperaturas más bajas o un tiempo menor pueden sobrevivir parcialmente.

Estas ampollas se colocan junto con la carga normal a autoclavar también establecida en la validación y luego se incuban a 60 ± 2° C durante 48 horas.

El área de Microbiología evalúa los resultados del bioindicador. Adicionalmente se emplean cintas indicadoras que tienen la propiedad de cambiar de color después del proceso.

- Por calor seco:

Se lleva a cabo en un horno calificado al que se le han determinado los puntos más fríos.

La esterilización se realiza a 170° C x 3 horas y la despirogenización a 250° C x 2 horas según calificación.

-- Esterilización y Despirogenización por calor seco:

Esterilización es el proceso por el cual se destruye totalmente las formas vivas (Microorganismos, hongos y levaduras) aplicando calor a altas temperaturas.

Despirogenización es el proceso de destrucción de pirógenos por medio del calor a temperaturas mucho mas elevadas. La correcta esterilización y despirogenización por calor seco es revisada en las cartillas circulares graficadoras del proceso que son verificados por microbiología y se corrobora con la prueba de esterilidad de ampollas vacías.

Este control es importante para verificar las condiciones de esterilidad de las ampollas de vidrio vacías empleadas en el envasado de inyectables y es una prueba de apoyo a la validación de llenado aséptico.

- Control de Flujos Laminares:

Según la frecuencia indicada en el procedimiento y durante la calificación de ambientes, se muestrean los flujos laminares tanto de microbiología como de las áreas de producción para evaluar el recuento de partículas viables que garanticen el buen estado de los filtros de la cabina, en paralelo se cuantifican las partículas no viables para tener un resultado global.

3.1.4 Control de calidad de producto terminado

El control de calidad de los productos inyectables incluye pruebas fisicoquímicas, detección de partículas extrañas, defectos de sellado, volumen de llenado y otras que se especifican en los libros oficiales; entre los principales ensayos para la forma farmacéutica de inyectables se encuentran el ensayo de esterilidad y la prueba de endotoxina bacteriana que se desarrolla con detalle posteriormente en este documento.

La prueba de esterilidad ⁽²⁰⁾ se emplea para verificar la ausencia de contaminación por microorganismos en productos esterilizados o preparados asépticamente. Durante el desarrollo del ensayo, el área de trabajo no debe

estar expuesta a la luz ultravioleta directa ni sometida a otros agentes esterilizantes. Deben realizarse monitoreos microbiológicos del área durante los ensayos.

La ausencia de contaminación microbiana, evidenciada por este procedimiento, confirma que el producto cumple con los requisitos del ensayo aunque el mismo no es suficiente para suponer la total esterilidad del lote ensayado, dadas las limitaciones inherentes a la estadística del muestreo.

Como medios de cultivo se utilizan el medio y el caldo Tioglicolato así como el caldo digerido de Caseína – Soja, a los cuales se les debe verificar la esterilidad de cada lote incubando una porción del lote a la temperatura especificada durante 7 días e incubando un recipiente con medio no inoculado como control negativo además del ensayo de promoción de crecimiento para determinar su capacidad de promover el crecimiento microbiano a través de la inoculación, por duplicado, en envases separados de cada medio, con menos de 100 microorganismos viables de cada una de las cepas adecuadas e incubando en las condiciones especificadas.

Los medios de cultivo son aceptables si existen evidencias de crecimiento en todos los envases inoculados dentro de los 5 días de incubación. Los ensayos pueden ser llevados a cabo simultáneamente con los ensayos de esterilidad. El ensayo de esterilidad no es válido si el medio de cultivo presenta una respuesta inapropiada al crecimiento microbiano.

Antes de efectuar un ensayo de esterilidad de un producto dado, se determinará el nivel de actividad bacteriostática y fungistática del mismo a través de los procedimientos que se describen a continuación.

Estos procedimientos se efectúan al menos cada vez que se cambia alguna condición del ensayo o la composición del producto.

- Método de filtración por membrana

Filtrar la cantidad de muestra a emplear para realizar el ensayo de esterilidad. Lavar la membrana, si fuera necesario, con tres porciones de 100 ml de la Solución de lavado y dilución apropiada, inoculando el lavado final con menos de 100 ufc. Repetir el lavado en otro filtro en el que no hubo pasaje de muestra (Control positivo). Colocar la membrana o la mitad de la membrana en 100 ml del medio de cultivo especificado o agregar el medio especificado al embudo que contiene la membrana. Repetir el procedimiento para los microorganismos y los medios especificados en la farmacopea e incubar los envases a la temperatura apropiada y bajo las condiciones señaladas, por un período no menor a 7 días.

Si el crecimiento de los microorganismos en la mezcla de producto y medio de cultivo fuera visualmente comparable al observado en los frascos del control positivo, se debe emplear la misma cantidad de producto y de medio de cultivo cuando se realice el ensayo de esterilidad.

Si el desarrollo microbiano del medio de cultivo con producto no es visualmente comparable al observado en el control positivo, el producto posee propiedades bacteriostáticas y/o fungistáticas. Repetir aumentando el número de lavados, cambiando el tipo de membrana, o empleando un agente neutralizante. Si no se logró neutralizar el residuo antimicrobiano de la membrana aún con 5 lavados de 500 ml cada uno, proceder con el ensayo de esterilidad.

- Método de transferencia directa

Inocular dos recipientes de cada medio de cultivo con menos de 100 ufc de los microorganismos especificados en la farmacopea, empleando los volúmenes de cada medio especificado. Agregar la cantidad de muestra especificada a uno de

los recipientes. El otro será el control positivo. Repetir el procedimiento para cada cepa e incubar durante no más de 7 días.

Si el crecimiento de los microorganismos en la mezcla de producto y medio de cultivo fuera visualmente comparable al observado en los frascos de control positivo, se emplea la misma cantidad de producto y de medio de cultivo cuando se efectúa el ensayo de esterilidad.

Si el desarrollo microbiano del medio de cultivo con producto no es visualmente comparable al observado en el control positivo, el producto posee propiedades bacteriostáticas y/o fungistáticas. Repetir el ensayo empleando agentes neutralizantes estériles, como polisorbato 80, lecitina o penicilinasas, o incrementar el volumen de medio. Emplear la menor cantidad de volumen de medio para no afectar el crecimiento de microorganismos en presencia del producto a ensayar. Si se incrementó el volumen del medio para no afectar el crecimiento de microorganismos en presencia del producto a ensayar. Si se incrementó el volumen del medio a 2 litros y aún posee propiedades antimicrobianas, proceder con el ensayo de esterilidad.

3.2 FUROSEMIDA, INYECCIÓN.

3.2.1 Monografía oficial USP 32

La inyección de Furosemida es una solución estéril de Furosemida en agua para inyección preparada con la ayuda de Hidróxido de Sodio, o si está destinada exclusivamente al uso veterinario, con la ayuda de Dietanolamina o Monoetanolamina. Contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de Furosemida ($C_{12}H_{11}ClN_2O_2S$).

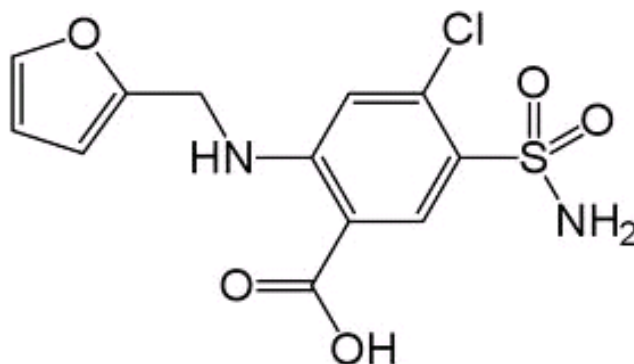


Figura N°1 Formula estructural de Furosemida

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases monodosis o multidosis de vidrio tipo I, resistentes a la luz.

Etiquetado—La etiqueta debe indicar si la inyección está destinada exclusivamente al uso veterinario.

Estándares de referencia USP <11>—ER Endotoxinas USP. ER Furosemida USP. ER Compuesto Relacionado A de Furosemida USP. ER Compuesto Relacionado B de Furosemida USP.

Identificación—Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL un volumen de inyección que equivalga aproximadamente a 40 mg de Furosemida, diluir a volumen con agua y mezclar. Diluir a volumen 2,0 mL de esta solución con hidróxido de sodio 0,02 N en un segundo matraz volumétrico de 100 mL y mezclar. Disolver aproximadamente 10 mg de ER Furosemida USP en 6,0 mL de hidróxido de sodio 0,1 N en un matraz volumétrico de 25 mL y diluir a volumen con agua. Diluir cuantitativamente 2,0 mL de la solución resultante con hidróxido de sodio 0,02 N para obtener una solución estándar de una concentración aproximada de 8 µg por mL. Determinar concomitantemente el

espectro de absorción UV de ambas soluciones: los espectros de absorción UV así obtenidos presentan máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda.

Endotoxinas bacterianas <85>—No contiene más de 3,6 Unidades USP de Endotoxinas por mg de Furosemida.

pH <791> — Entre 8,0 y 9,3 o, cuando la etiqueta indica que el producto está destinado exclusivamente al uso veterinario, entre 7,0 y 7,8 si contiene Dietanolamina, o entre 8,0 y 9,3 si contiene Monoetanolamina.

Partículas <788> — Cumple con los requisitos para inyecciones de pequeño volumen.

Límite de compuesto relacionado B de Furosemida—NOTA—proteger las soluciones de Furosemida de la exposición de la luz

[Fase móvil, solución de dilución, solución de aptitud del sistema y sistema cromatográfico—preparar según se indica para la prueba de compuestos relacionados en Furosemida.]

Solución estándar—preparar una solución en la Solución de dilución que contenga 10,0 µg de ER compuesto relacionado B de Furosemida USP por mL.

Solución de prueba—transferir a un matraz volumétrico de 10 mL un volumen de inyección, medido con exactitud, que equivalga aproximadamente a 10 mg de Furosemida, agregar Solución de dilución a volumen y mezclar

Procedimiento—inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la solución estándar y de la solución de prueba, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. La respuesta a 254 nm obtenida para cualquier pico observado en el

cromatograma de la solución de prueba con un tiempo de retención correspondiente al del Estándar de Referencia en la solución estándar no es mayor que la respuesta a 254 nm obtenida para el pico en el cromatograma de la solución estándar, correspondiendo a no más de 1,0 % del compuesto relacionado B de la Furosemida. Cuando la etiqueta indica que la inyección está destinada exclusivamente al uso veterinario, la respuesta a un tiempo de retención correspondiente al del Estándar de Referencia de la solución estándar, no supera en más de 2,5 veces la respuesta a 254 nm obtenida para el pico en el cromatograma de la solución estándar, correspondiendo a no más de 2,5 % del compuesto relacionado B de la Furosemida.

Otros requisitos—cumple con los requisitos en Inyectables <1>.

Valoración— [NOTA—proteger las soluciones de Furosemida de la exposición a la luz.]

Fase móvil, solución de dilución, solución de aptitud del sistema y sistema cromatográfico—preparar según se indica para la prueba de compuestos relacionados en Furosemida.

Preparación estándar—disolver una cantidad de ER Furosemida USP, pesada con exactitud, en la Solución de dilución para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,0 mg por mL, agregar solución de dilución a volumen y mezclar.

Procedimiento—inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la preparación estándar y la preparación de valoración, registrar los cromatogramas y medir la respuestas correspondientes a los picos. Empleando la respuesta a 254 nm, calcular la cantidad, en mg, de Furosemida (C₁₂H₁₁ClN₂O₅S) por mL de la inyección tomado, por la fórmula:

$$10(C/V)(r_u/r_s)$$

En donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Furosemida USP en la preparación estándar; V es el volumen, en mL, de inyección tomado; y r_u y r_s son las respuestas de los picos obtenidas con la preparación de valoración y la preparación estándar respectivamente.

3.2.2 Información farmacológica ⁽²³⁾

3.2.2.1 Forma farmacéutica: Solución inyectable (IM-IV)

3.2.2.2 Datos clínicos:

Indicaciones terapéuticas

- Hipertensión acompañada de una afectación visceral que ponga en peligro el pronóstico vital a muy corto plazo (emergencia hipertensiva), en particular en caso de:
 - encefalopatía hipertensiva,
 - descompensación ventricular izquierda con edema pulmonar.
- Urgencias cardiológicas: edema pulmonar agudo, asistolia.
- Retención de sodio grave de origen cardíaco, renal, cirrótico.
- Radiología de las vías urinarias bajas y prueba de lavado ("wash out") con furosemida.
- Puede utilizarse en reanimación pediátrica.

3.2.2.3 Posología y forma de administración

En el tratamiento de la emergencia hipertensiva, la dosis deberá adaptarse de modo que la reducción de la presión arterial no supere el 25% del nivel inicial durante la hora posterior al inicio del tratamiento inyectable; de hecho, una caída demasiado brusca de la presión puede permitir una isquemia miocárdica, cerebral o renal.

Adultos

Vía parenteral: De 2 a 3 ampollas diarias por vía I.V. lenta o por vía I.M.:

- Para tratar un edema pulmonar agudo, es posible volver a administrar la inyección en caso de un resultado insatisfactorio.
- Es posible efectuar una nueva administración por vía oral en cualquier momento del tratamiento 3 horas después de una inyección de Furosemida.

Niños

Vía IV: 0,5 a 1 mg/kg diarios.

3.2.2.4 Propiedades farmacológicas

- Propiedades farmacodinámicas

Diurético de Asa. Código del Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química (ATC): C03CA01

- Acción diurética natriurética:

A las dosis terapéuticas habituales, la furosemida actúa principalmente al nivel de la rama ascendente del asa de Henle o inhibe la reabsorción del cloro y, como resultado, del sodio. Posee una acción complementaria al nivel del túbulo proximal y del segmento de dilución.

Además, incrementa el flujo sanguíneo renal para beneficio de la zona cortical. Esta propiedad es especialmente interesante en caso de asociación con los betabloqueantes que pueden ejercer un efecto inverso.

No altera la filtración glomerular (en ciertas circunstancias, se ha podido constatar un incremento de ésta). La acción diurética natriurética aumenta en 2proporción a las dosis administradas y persiste en caso de insuficiencia renal.

- Acción antihipertensora y otras acciones:

Posee una acción hemodinámica que se caracteriza por la disminución de la presión capilar pulmonar incluso antes de la aparición de diuresis, y por el incremento de la capacidad de almacenamiento del lecho vascular venoso constatado por pletismografía (estas propiedades se han estudiado de forma más detallada por vía IV).

La furosemida se utiliza para tratar todas las formas de retención hidrosalina con una respuesta proporcional a la dosis.

La furosemida ejerce una acción antihipertensora debida a la reducción de sodio y a la acción hemodinámica.

3.2.2.5 Propiedades farmacocinéticas

Tras la administración parenteral, la eliminación se realiza esencialmente por la orina. El efecto diurético natriurético se observa a partir de los 5 minutos posteriores a la administración intravenosa.

La semivida de eliminación media es de una hora, aproximadamente. Esta semivida es mayor en los bebés prematuros.

La eliminación digestiva (biliar) es mayor en caso de insuficiencia renal. Por esto, no se produce acumulación del producto.

La furosemida se excreta en la leche materna.

3.2.2.6 Contraindicaciones

Este medicamento no debe administrarse en caso de:

- insuficiencia renal aguda funcional,
- encefalopatía hepática,
- alergia a las sulfamidas,

- obstrucción en las vías urinarias en caso de oliguria,
- hipovolemia o deshidratación,
- lactancia.

En pacientes sometidos a hemodiálisis y con insuficiencia renal grave, será necesario eliminar la hepatitis en evolución y la insuficiencia hepatocelular grave, ya que debido a la insuficiencia renal asociada la eliminación se realiza por vía biliar, por lo que existe riesgo de acumulación.

En general, no se recomienda el uso de este medicamento durante el embarazo ni tampoco en asociación con litio o sultoprida.

3.2.2.7 Advertencias

La toma accidental de furosemida puede conllevar hipovolemia con deshidratación.

En pacientes con insuficiencia hepatocelular, el tratamiento deberá administrarse con prudencia bajo control hidroelectrolítico estricto dado el riesgo de encefalopatía hepática. Si se produjera, el tratamiento deberá interrumpirse inmediatamente.

El incremento hipertensivo que suele acompañar a los accidentes cerebrovasculares no suele constituir una indicación para el tratamiento antihipertensor de emergencia. La decisión debe tomarse en función de la presencia de complicaciones viscerales que pongan en peligro el pronóstico vital a corto plazo.

Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

Asociaciones no recomendadas:

- Litio: incremento de la litemia con signos de sobredosis, como en caso de una dieta sin sodio (disminución de la eliminación urinaria de litio).

Si no es posible evitar la asociación, será necesario efectuar un control estricto de la litemia y adaptar la posología.

- Sultoprida: incremento del riesgo de trastornos del ritmo ventricular, en concreto *torsades de pointes* (la hipopotasemia es un factor contributivo). Control clínico, biológico y electrocardiográfico.

Asociaciones que requieren precauciones de empleo:

- AINE (vía sistémica), incluyendo los inhibidores selectivos de la COX-2, el ácido acetilsalicílico, etc.: insuficiencia renal aguda en enfermos de riesgo (ancianos o deshidratados) por disminución de la filtración glomerular (inhibición de las prostaglandinas vasodilatadoras debido a los AINE).
- Otros hipopotasemiantes: anfotericina B (vía IV), gluco y mineralocorticoesteroides (vía sistémica), tetracosactida, laxantes estimulantes: incremento del riesgo de hipopotasemia (efecto aditivo).
- Digitálicos: hipopotasemia que favorece los efectos tóxicos de los digitálicos.
- Diuréticos ahorradores de potasio (amilorida, canreonato de potasio, espironolactona, triamtereno): la asociación racional, útil en determinados pacientes, no excluye la aparición de hipopotasemia o, en particular en pacientes con insuficiencia renal y diabéticos, la hiperpotasemia.
- Aminoglucósidos (vía parenteral): incremento de los riesgos nefrotóxicos y ototóxicos de los aminoglucósidos (insuficiencia renal funcional

relacionada con la deshidratación provocada por el diurético). La asociación se permite bajo control del estado de hidratación y de las funciones renales y cocleovestibulares y, llegado el caso, de las concentraciones plasmáticas del aminoglucósido.

- Fenitoína: disminución del efecto diurético que puede alcanzar el 50%. Es posible utilizar dosis superiores de diurético.
- Carbamazepina: riesgo de hiponatremia sintomática
- Inhibidores de la enzima convertora de angiotensina (IECA), antagonistas de la angiotensina II: riesgo de hipotensión arterial extrema o insuficiencia renal aguda por el inicio del tratamiento con un IECA o un inhibidor de la angiotensina II, en caso de deshidratación isotónica preexistente.
- Metformina: acidosis láctica debida a la metformina desencadenada por una posible insuficiencia renal funcional relacionada con los diuréticos y, más concretamente, los diuréticos de asa.
No utilizar metformina si la creatininemia es superior a 15 mg/litro (135 μ mol/litro) en hombres y 12 mg/litro (110 μ mol/litro) en mujeres.
- Medios de contraste yodados: en caso de deshidratación provocada por diuréticos aumenta el riesgo de insuficiencia renal aguda, en particular al utilizar dosis importantes de medios de contraste yodados.
- Baclofeno: incremento del efecto antihipertensor.
Control de la presión arterial y adaptación posológica del antihipertensor si es necesario.

Asociaciones a tener en cuenta:

- Corticoesteroides, tetracosactida (vía sistémica) (salvo hidrocortisona empleada como tratamiento sustitutivo en la enfermedad de Addison): reducción del efecto antihipertensor (retención hidrosalina de los corticoesteroides).
- Neurolépticos, antidepresivos imipramínicos (tricíclicos): Incremento del efecto antihipertensor y el riesgo de hipotensión ortostática (efecto aditivo).
- Amifostina: Incremento del efecto antihipertensor.
- Calcio (sales de): Riesgo de hipercalcemia por la disminución de la eliminación urinaria del calcio.
- Ciclosporina: Riesgo de incremento de la creatininemia sin modificación de las concentraciones plasmáticas de ciclosporina, incluso en ausencia de deshidratación isotónica.

3.2.2.8 Embarazo y lactancia

Embarazo:

- Los estudios efectuados en animales han puesto de manifiesto un efecto teratógeno.
- En clínica, no se dispone de datos lo bastante pertinentes para evaluar una posible malformación o fetotoxicidad de la furosemida al administrarla durante el embarazo.

Por regla general, la furosemida no debe administrarse en mujeres embarazadas y no debe recetarse nunca en casos de edema fisiológico del

embarazo (que, por lo tanto, no requieren tratamiento). En efecto, los diuréticos pueden provocar isquemia fetoplacentaria, con riesgo de hipotrofia fetal.

No obstante, los diuréticos (en forma oral) siguen siendo un elemento esencial del tratamiento de los edemas de origen cardíaco, hepático y renal en embarazadas.

Lactancia:

La furosemida se excreta en la leche materna. Los diuréticos de asa reducen la secreción láctica y la lactancia se inhibe a partir de una dosis única de 40 mg.

Por consiguiente, el uso de este medicamento está contraindicado en mujeres en período de lactancia.

3.2.2.9 Reacciones adversas

Ocasionalmente, durante el tratamiento puede producirse un incremento discreto de la uricemia (del orden de 10 a 30 mg/l), y de forma excepcional un ataque de gota.

A veces se observa un incremento de la glucemia, con frecuencia durante la administración corta e intensa sobre todo por vía intravenosa. Sólo se han descrito casos excepcionales de disminución de la tolerancia a la glucosa.

Es posible observar alteraciones hidroelectrolíticas en relación con la actividad del producto: deshidratación, hiperazotemia, hiponatremia, hipovolemia acompañada de hipotensión ortostática que justifica la suspensión del medicamento o la reducción de la posología. La asociación a una dieta sin sodio demasiado estricta favorece estas alteraciones.

Es posible observar algunas hipopotasemias asociadas o no a alcalosis metabólica. Suelen ser más frecuentes al utilizar dosis altas o en pacientes

cirróticos, desnutridos o con insuficiencia cardíaca. Estas hipopotasemias pueden ser especialmente graves en pacientes con insuficiencia cardíaca y, por otro lado, pueden comportar trastornos graves del ritmo, en particular torsades de pointes (potencialmente mortales), sobre todo en asociación con antiarrítmicos del grupo de la quinidina.

Se han observado algunos casos infrecuentes de calcificaciones renales asociadas a hiper calciuria en bebés muy prematuros tratados con dosis altas de furosemida inyectable, en caso de cardiopatía congénita con insuficiencia cardíaca.

En caso de insuficiencia hepatocelular, existe la posibilidad de desencadenamiento de encefalopatía hepática.

Se han constatado algunos casos infrecuentes de reacciones cutáneas ocasionalmente ampollares, dolores lumbares, leucocitopenias y trombocitopenias.

Posibilidad de trastornos digestivos.

La administración de dosis muy altas de furosemida inyectable, en particular cuando no se ha observado la velocidad de inyección recomendada (de 4 a 6 minutos para la inyección IV directa o 4 mg por minuto para la infusión), puede provocar reducciones transitorias de la agudeza auditiva y, en asociación con un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, ototóxicos, se han observado algunos casos infrecuentes de afectaciones definitivas de forma excepcional.

3.3 TOXINAS BACTERIANAS

Existen dos tipos de toxinas bacterianas: las exotoxinas y las endotoxinas.

El termino endotoxinas se emplea para describir las actividades tóxicas que se relacionan con componentes de la cubierta bacteriana. Suele referirse a las

actividades de la parte del lípido A en el Lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gramnegativas.

Las endotoxinas llevan el sufijo “endo” porque forman parte de la estructura de la bacteria, mientras que a las exotoxinas se les antepone “exo” porque son productos bacterianos no estructurales que se liberan al ambiente.

Las exotoxinas son proteínas (a menudo enzimas) solubles, termolábiles que el microorganismo patógeno libera en su microambiente durante su crecimiento. Son sintetizados por agentes patógenos específicos que poseen plásmidos o profagos que transportan los genes codificadores de la exotoxina, son proteínas termolábiles que se inactivan entre los 60 y 80° C son tóxicas en dosis pequeñas ($\mu\text{g/g}$ por ejemplo con la toxina del botulismo), estimulan la producción de anticuerpos (antitoxinas), son incapaces de producir fiebre y se clasifican como neurotoxinas, citoxinas o enterotoxinas según su mecanismo de acción. (6)

Las endotoxinas están presentes en la pared externa de las bacterias Gramnegativas. Se denominan así porque están ligadas a la bacteria y se liberan cuando el microorganismo es destruido, parte de las endotoxinas también se liberan durante la multiplicación bacteriana. Son termoestables, tóxicas en dosis elevadas, por lo general las endotoxinas se liberan en forma de burbujas de membrana externa, fuertemente impregnadas con LPS; estas burbujas activan los complementos a través de la vía alterna y conducen a la formación de interleucina I, factor de necrosis tumoral, factor activador de plaquetas, óxido nítrico y otras moléculas efectoras que causan la fiebre, la trombosis y la hipotensión características de la sepsis.

3.3.1 Componentes de la cubierta celular bacteriana

La cubierta celular de una bacteria es el conjunto de capas integrales que la rodean, llamadas de manera específica membranas celulares y pared celular.

La bacteria Gramnegativa típica tiene una cubierta que consta de una membrana citoplásmica, una pared celular delgada y una membrana externa, con una hojuela externa formada sobre todo por una molécula similar a un fosfolípidos, que se llama lipopolisacárido. (Ver figura N°2)

A diferencia de la membrana citoplásmica, la membrana externa es asimétrica conformada sobre todo por lipopolisacárido que tiene 3 regiones diferentes que se conocen como antígeno O, parte interna y lípido A. el antígeno O (antígeno somático bacteriano) se extiende desde la superficie de la bacteria hacia el ambiente; el centro interno y el externo enlazan el antígeno O con el Lípido A; que flota en la hoja exterior de la membrana externa. El lípido A es un mitógeno de células B directamente toxico para ciertas células huésped y es una superficie activadora para la vía alterna de activación de complementos. Aunque toda molécula de LPS se conoce como endotoxinas, en realidad la porción del lípido A del LPS es la que constituye la endotoxina. La inyección de LPS es la que produce efectos tóxicos sistémicos en animales y humanos como fiebre, hipotensión y muerte. (15)

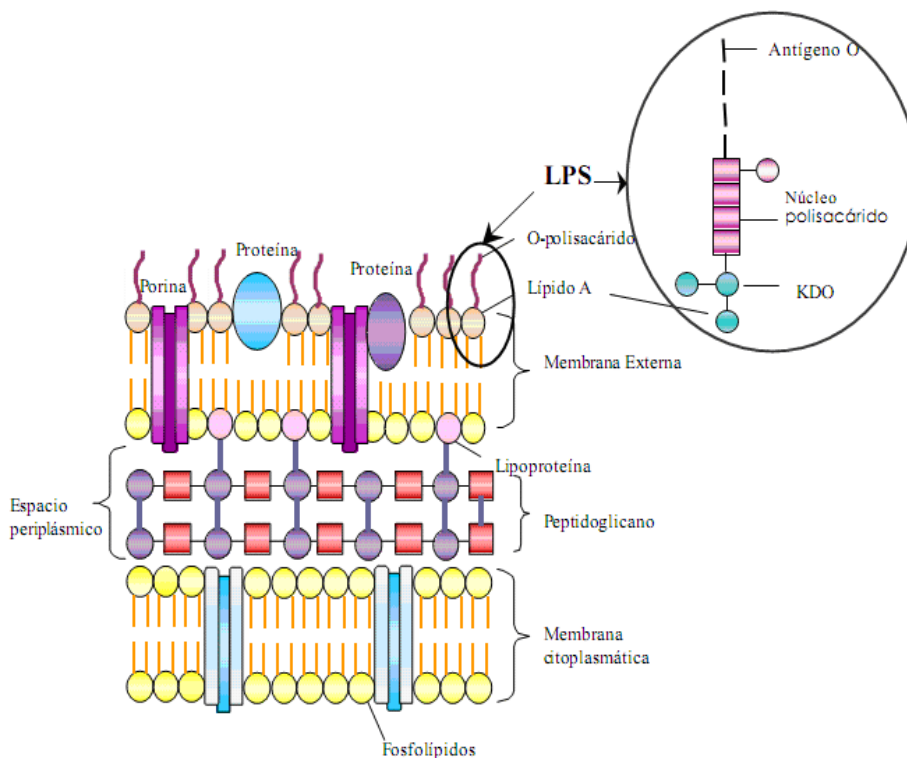


Figura N° 2. Pared celular de una bacteria Gramnegativa.

3.3.2 Pirógenos: endotoxinas bacterianas

La palabra pirógeno se deriva de los vocablos: piro = fuego y gen = origen. Las primeras observaciones de reacciones pirogénicas datan de 1911 por Wechbelman quien describió ocasionales aumentos de temperatura y escalofríos en pacientes a quienes les administraba Arsfenamia por inyección intravenosa. Posteriormente Hart y Peridolf comprobaron que la inyección de agua destilada en un aparato de vidrio no producía fiebre si se administraba recién destilada. En 1923 Sieber evidenció que las fiebres descritas por Wechbelman se originaban por presencia de sustancias de origen bacteriano, dando el nombre de pirógenos, estableciendo que dichas sustancias podían ser bacterias muertas, intactas o desintegradas o generalmente productos del

metabolismo bacteriano. Sus experiencias le condujeron a desarrollar la prueba de pirógenos en conejos. (4)

Las bacterias Gram positivas, micobacterias, hongos e incluso virus pueden producir sustancias pirogénicas, sin embargo los pirógenos producidos por las bacterias Gram negativas, las “Endotoxinas” poseen actividad pirogénica mayor que la de cualquier otra sustancia, es por ello que se ha generalizado que la ausencia de endotoxinas en un inyectable, indica ausencia de compuestos pirogénicos en general.

Las endotoxinas bacterianas son complejos de lipopolisacáridos (LPS) de alto peso molecular que constituyen el principal componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas patógenas o no patógenas tales como *E. coli*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus* y otros.

Las células viables producen pequeñas cantidades de endotoxinas durante su vida, pequeñas cantidades pueden ser liberadas en forma soluble especialmente por los cultivos jóvenes, sin embargo la mayor cantidad tiene lugar después de la muerte y lisis de la célula bacteriana. (21) Durante casi 100 años, el término endotoxina ha descrito una toxina termoestable, pirogénica y potencialmente letal de las bacterias Gramnegativas que se había constituido en una plaga para la Industria farmacéutica pues la administración de fármacos contaminados con éstas producía complicaciones e incluso la muerte de los pacientes. (2)(29)

3.3.2.1 Regiones de las Endotoxinas Bacterianas:

Las endotoxinas tienen tres regiones denominadas como I, II y III.

Región I:

El lípido A es el componente lipídico, es la región hidrofóbica del LPS, consiste en un disacárido de N-acetilglucosamina (NAG) fosforilada con 6 a 7 ácidos grasos saturados. La estructura del lípido A es muy similar entre las bacterias Gramnegativas.

Región II:

Se encuentra unida a la posición 6 de un NAG. El antígeno R consiste en una corta cadena de azúcares. Se consideran 2 subregiones:

La fracción del núcleo interno: Se encuentran 2 carbohidratos típicos de las bacterias Gramnegativas: el ácido 2-ceto-3-deoxioctonoico (KDO) y

L-glicero-D-manoheptosa. El KDO es único y siempre presente en LPS y constituye un indicador de endotoxinas.

La fracción del núcleo externo:

Esta constituido a base de hexosas (glucosa, galactosa), NAG, y a veces algunas hexosas más raras. Con algunas variaciones ligeras, el polisacárido es común en todos los miembros de las bacterias del género *Salmonella*, pero es estructuralmente diferente en otros géneros de bacterias Gramnegativas.

Los géneros de *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia* tienen su parte polisacárida similar pero no idéntica.

Región III:

Se encuentra unido al polisacárido R. Consiste en subunidades repetidas de oligosacáridos de 3 a 4 azúcares.

Las cadenas individuales varían en longitud hasta más de 40 unidades repetidas. El polisacárido es más grande que el núcleo polisacárido y mantiene el dominio hidrofílico del LPS, es el principal determinante antigénico de la pared celular. (16) (29)

Con la finalidad de protegerse de una infección, la primera medida de nuestro organismo es detectar la presencia de microorganismos extraños, reconociendo moléculas no asociadas a células humanas. Estas moléculas infecciosas se unen a un receptor promoviendo la liberación de proteínas de defensa denominadas citokinas. Este principio también se aplica en las endotoxinas. La secuencia de la reacción pirogénica (Ver figura N° 3) es la siguiente: El lipopolisacárido (LPS) es liberado de la membrana externa de su pared celular por lisis de la bacteria (el LPS puede encontrarse por ejemplo en un producto inyectable contaminado y llega al torrente sanguíneo durante la administración); se une a una proteína de unión al LPS, formándose un complejo “LPS-Proteína de unión”, este complejo viaja a través de la sangre y se une al receptor CD14 ubicado en la superficie de los macrófagos; (este es el mecanismo normal de defensa por el cual el organismo reconoce que hay invasión por bacterias). Los macrófagos se activan liberando moléculas de defensa, las citokinas.

Las citokinas se unen a sus receptores en células específicas produciéndose mediadores inmunológicos de defensa innatos como, fiebre, inflamación, fagocitosis. Si se liberasen gran cantidad de citokinas, se produciría daño a nivel de vasos sanguíneos, disfunción respiratoria, destrucción de tejidos, hipotensión, shock y muerte.

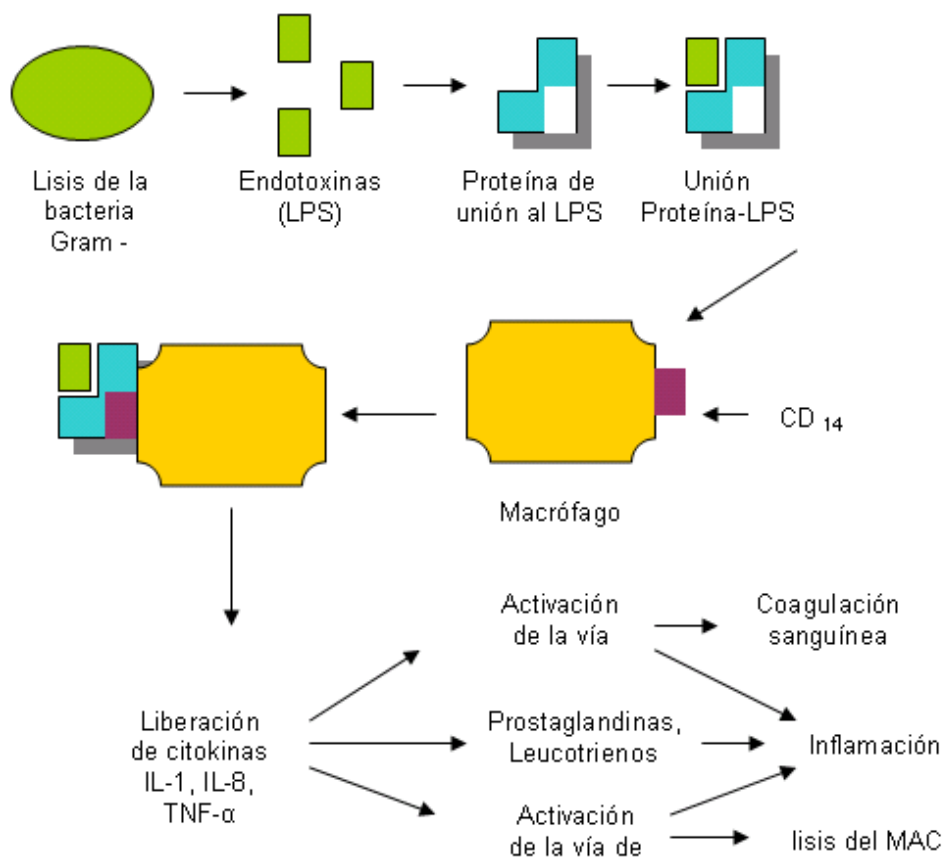


Figura N° 3. Liberación de endotoxinas bacterianas

3.3.2.2 Mecanismo de la fiebre

El LPS posee escasa bioactividad directa, pero es una señal molecular que induce a los macrófagos para que produzcan pirógenos endógenos los cuales a su vez inducen la producción de mediadores como las prostaglandinas que actúan directamente sobre los centros de control de temperatura del cerebro. Estos pirógenos endógenos incluyen: IL -1 (Interleucina 1), TNF - α (Factor de necrosis tumoral alfa), IL - 6, etc. Las tres primeras citocinas inducen fiebre a través de la inducción de síntesis de prostaglandinas (PG- E2) las cuales

actúan en forma directa sobre los centros de fiebre en el hipotálamo. Las prostaglandinas también causan aumento de la permeabilidad vascular. (27)

3.4 PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA

Durante la elaboración de productos inyectables hay que tomar todas las medidas concebibles para evitar la contaminación pirogénica, así como disponer de un ensayo confiable de control en el producto terminado.

En los últimos años, los principales organismos reguladores de productos farmacéuticos (Farmacopeas) exigen cada vez más en sus monografías la aplicación del método del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) para la liberación de pirógenos en productos terminados parenterales. El análisis de pirógenos constituye uno de los principales ensayos en el control de calidad de la fabricación de inyectables por su repercusión en la salud humana, puesto que la presencia y administración de los mismos, es capaz de provocar una serie de respuestas fisiológicas, en su mayoría de carácter perjudicial y en casos extremos, la muerte del paciente. Por las razones anteriores, existe un creciente interés en el conocimiento y dominio de estos métodos.

Por más de 40 años el ensayo de pirógenos mediante la determinación de la respuesta febril en conejos, permaneció prácticamente invariable y su efectividad fue escasamente cuestionada. En la actualidad, para la aprobación y comercialización de gran parte de los productos farmacéuticos y biotecnológicos diseñados para ser administrados por vía parenteral, las principales instituciones reguladoras internacionales exigen el control de pirógenos por el método del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL). El LAL es un método *in vitro* que detecta con alta sensibilidad la presencia de endotoxinas bacterianas. (9)

La prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), cuando es utilizada de acuerdo a las directivas de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, Food and Drug Administration) de los Estados Unidos, ⁽²¹⁾ puede reemplazar la prueba de pirógenos (prueba de fiebre de conejos) de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), para el control de producto terminado de “drogas inyectables para uso humano (incluyendo productos biológicos), drogas inyectables para uso animal y dispositivos médicos”. La prueba oficial a la que se hace referencia en monografías específicas de la USP es la Prueba de Endotoxinas Bacterianas de la USP (USP Bacterial Endotoxins Test) ⁽¹¹⁾

Ante las disposiciones de las Farmacopeas e Instituciones Reguladoras Internacionales, el ensayo del LAL gana cada vez más el interés de la Industria Farmacéutica y Biotecnológica nacional. Teniendo en cuenta además el notable desarrollo que ha alcanzado el método y su importancia para el cumplimiento de las Buenas Prácticas en el proceso de fabricación de inyectables, se presenta a continuación parte de su historia y el desarrollo de la prueba.

3.4.1 Historia

La historia del descubrimiento del reactivo LAL comienza en 1956, cuando el doctor Frederick B. Bang reporta la muerte por coagulación intravascular en el cangrejo herradura americano *Limulus polyphemus* (Ver figura N°4). Bang, junto a Jack Levin, revela en 1964 que las endotoxinas son el vector causante de la coagulación de la hemolinfa del *Limulus*. Cuatro años más tarde, estos investigadores comprueban que los elementos responsables de la coagulación inducida por endotoxinas son de naturaleza enzimática, y se encuentran dentro de los amebocitos, único tipo de células presentes en la hemolinfa azul de los cangrejos herraduras. Por lo tanto, el reactivo LAL es un extracto acuoso de los amebocitos, compuesto por una cascada de enzimas serino proteasas tipo tripsina capaz de reaccionar frente a pequeñas cantidades de endotoxinas. La

bioquímica de la reacción del LAL se conoce en detalle y el mecanismo en cascada parece ser el responsable de su extraordinaria sensibilidad. (2)



Figura N°4. Cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*).

El *Limulus* habita en algunos puntos de la costa del Atlántico de los Estados Unidos hasta el Golfo de México, existen otras 3 especies de cangrejos herraduras oriundos del continente asiático: el *Tachypleus tridentatus*, el *Carcinoscorpius rotundicauda* y el *Tachypleus gigas*. Estos animales son artrópodos marinos muy conocidos por su récord fósil debido a que evolucionaron muy poco en los últimos 300 millones de años.

Las células sanguíneas circulantes (amebocitos) del sistema circulatorio [hemolinfa] presentes en ciertas especies de Limulidos, en especial el cangrejo bayoneta (*Limulus polyphemus*) y el cangrejo japonés (*Tachypleius tridentatus spp.*) contienen gránulos de proteína que se gelifica en la presencia de endotoxina de muchas especies de Gram negativos.

El hemocito granular o amebocito es la principal célula circulante en el cangrejo adulto. Se caracteriza por contener gránulos grandes y pequeños: los gránulos mayores contienen 4 factores de coagulación y un factor antimicrobiano (factor anti LPS), se liberan más rápidamente que los pequeños, ambas poblaciones se liberan por exocitosis y coagulación, con un lapso de aproximadamente de 90 seg. El mecanismo de reacción se basa en enzimas con actividad de proteasas de serina en forma de zimógenos (factores C, B, una enzima procoagulante, y el coagulógeno).

Esta reacción ha sido empleada como la base de un ensayo cualitativo o semicuantitativo para endotoxina, siendo el reactante la proteína obtenida de los amebocitos lisados de *Limulus*, ensayo conocido como Lisado de Amebocito de *Limulus* (LAL).

El objetivo final de este ensayo es la detección de la gelación de la proteína después de ser incubada con endotoxina bajo ciertas condiciones.

3.4.2 Principios Biológicos.

El sistema de coagulación de *Limulus polyphemus* está contenido en los amebocitos, y las proteínas derivadas de los amebocitos lisados se coagulan en presencia de la endotoxina, siendo la ruta de esta reacción dependiente de la concentración de endotoxina. Bang y Levine fueron los primeros en sugerir que la gelación inducida por endotoxina era mediada enzimáticamente. El mecanismo de reacción se cree que implica la activación de una enzima procoagulante por Ca^{2+} y endotoxina. Esta enzima activada cataliza la ruptura hidrolítica de una proteína coagulable [coagulógeno] a subunidades polipeptídicas.

La naturaleza química del coagulógeno ha sido estudiada en las dos especies de limúlidos descritos: en el cangrejo bayoneta, el coagulógeno es un polipéptido de 235 residuos de aminoácidos. La coagulación ocurre por clivaje

en el aminoácido 45 a partir del carboxilo terminal, resultando en la liberación de un péptido C soluble, y un residuo insoluble de 170 aminoácidos. Este péptido insoluble de 170 residuos se denomina coagulina, y es el responsable de la polimerización para formar un coágulo estable. El mecanismo por el cual el coagulógeno es clivado por la enzima procoagulante se cree que es similar al de la tripsina, una hidrolasa de serina, o al de la activación de protrombina para formar trombina. (25)

3.4.3 Bioquímica LAL- Endotoxina: Reacción de Coagulación

En presencia de endotoxinas, el reactivo LAL produce una cascada de reacciones enzimáticas conocida como la Vía del Factor C que se compone de tres zimógenos serina proteasas intracelulares: Factor C, Factor B y una enzima pro-coagulante que actúan sobre el coagulógeno (proteína coagulable de los invertebrados similar al fibrinógeno)

El factor C es un biosensor que detecta las endotoxinas iniciando la cascada de reacciones con su activación autocatalítica, al contacto con endotoxinas, el factor C se activa; este hidroliza y activa al factor B. El factor B activa a la enzima pro-coagulante (enzima de coagulación inactiva), la cual en presencia de cationes divalentes (Ca^{++} / Mg^{++}) (18) se convierte en la enzima coagulante (enzima de coagulación activada). La enzima coagulante se une al sitio específico del coagulógeno (sustrato) y produce un gel de coagulina. (Ver figuras N°5 y N°6).

La pared celular de hongos y levaduras contienen diversos polímeros que incluyen celulosa, quitina, mananos y (1,3) beta glucanos. Se conoce que existe otra reacción de coagulación conocida como la Vía de Factor G, por la cual los (1,3) beta glucanos de la superficie de algunos hongos activan el factor G que convierte la enzima procoagulante en enzima coagulante y actúa sobre el coagulógeno produciendo coagulina.

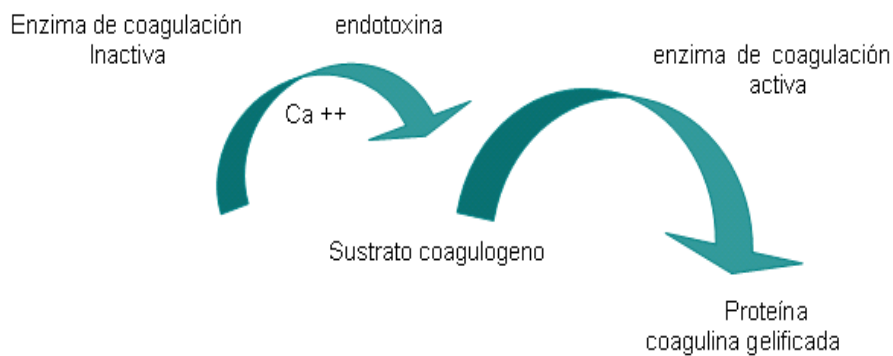


Figura N°5. Representación de la cascada de reacciones que experimenta el reactivo LAL en presencia de Endotoxinas – Modelo Lenin 1979.

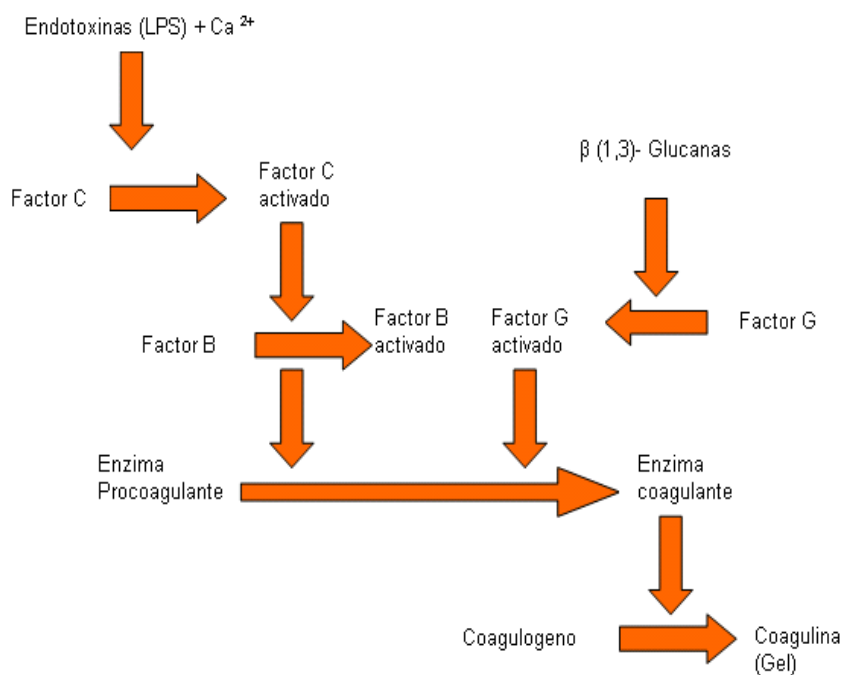


Figura N°6. Cascada de coagulación de las endotoxinas frente al reactivo LAL.

3.4.4 Métodos del LAL ⁽¹¹⁾

Existen 3 variaciones básicas del ensayo del LAL en el mercado: método de gelificación o gel-clot, turbidimétricos y cromogénicos. Cada fabricante de reactivos describe su propia metodología, pero en general la diferencia entre los protocolos es pequeña. La correlación entre los métodos se basa en comparar la menor dilución de un producto dado a la cual se elimina la interferencia.

LAL significa “Limulus ameocyte lysate” que describe al reactivo: Limulus es el nombre científico del cangrejo de la herradura, ameocyte (amebocito) es la célula sanguínea que contiene la sustancia que produce coagulación y lysate (lisado) describe el proceso de lisis al que es sometida dicha célula sanguínea para la obtención del reactivo.

Para la elaboración del reactivo LAL, los cangrejos son colectados del mar y transportados al laboratorio donde son desangrados por punción en el corazón con una aguja larga; la sangre o hemolinfa conteniendo los amebocitos se colecta por gravedad en una botella de centrífuga.

Puede colectarse el 30% de su sangre sin afectar al animal que es luego devuelto al mar. ⁽⁷⁾

En general, existe una correlación moderada entre los métodos cuando el reactivo LAL es producido por el mismo fabricante e incluso mejor si es del mismo lote, mientras que puede ser muy diferente hasta para el mismo método cuando el reactivo se produce por distintos fabricantes. Es por esto que uno de los aspectos críticos es la validación del ensayo, con lo cual se garantiza independientemente del método o lote que a una dilución determinada del producto no existan interferencias y por lo tanto, sea confiable la cuantificación de endotoxinas en dicha muestra. Aún subsisten confusiones con respecto a la validación del método, hay que puntualizar que lo que se valida es la muestra o su dilución, no se trata, por ejemplo, de realizar ensayos de linealidad, exactitud o precisión como se describe para la mayoría de los métodos analíticos. La

validación del LAL se presenta en detalle en la guía de la FDA, la cual se toma de referencia para el desarrollo de la presente. (Ver anexo N°2)

- Método de gelificación o gel-clot.

El método de gel-clot es el ensayo clásico y el más elemental entre los métodos del LAL. La reacción desarrollada en el tubo de ensayo es esencialmente la misma que ocurre in vivo en la hemolinfa del cangrejo herradura frente a las endotoxinas. Es el ensayo menos susceptible a inhibición y requiere de un equipamiento más sencillo y menos costoso.

La presencia de endotoxinas es determinada por la formación de un gel o coágulo insoluble. Se puede desarrollar de forma cuantitativa o semicuantitativa (ensayo límite). Produce resultados binarios, positivo (+) o negativo (-). Un tubo es positivo cuando el gel permanece intacto después de que se invierte cuidadosamente un ángulo de 180 °, cualquier otra condición es interpretada como negativa. El alcance del método está limitado únicamente por la sensibilidad del lisado. El mercado oferta reactivos para gel-clot con sensibilidades de 0,03; 0,06 y 0,12 UE/mL (unidades de endotóxicas por mililitro). Con este método no se podrán cuantificar endotoxinas por debajo del nivel (sensibilidad) al cual se forma un gel sólido.

- Métodos turbidimétricos.

Estos métodos se fundamentan por el aumento de la turbidez en la mezcla de reacción provocado por el incremento de la concentración de coagulina insoluble, la cual se monitorea espectrofotométricamente. La proporción del aumento de turbidez está relacionada con la concentración de endotoxinas en la muestra. Los métodos turbidimétricos son los más sensibles, capaces de detectar hasta 0,001 UE/mL. Existen 2 variaciones del método turbidimétrico:

- Turbidimétrico de punto final:

Este método fue comercializado por primera vez por Worthington Inc. (está compañía ya no está en el mercado del LAL) y se emplea raramente en la actualidad. El principal inconveniente de este ensayo es que requiere un tiempo de incubación y lectura controlado, muy cuidadoso, la reacción no se detiene y por lo tanto el desarrollo de turbidez continúa. Las muestras podrán leerse a un tiempo fijo y solo una vez.

- Turbidimétrico cinético:

Levin y Bang en 1968 fueron los primeros en proponer un método turbidimétrico cinético para la determinación de endotoxinas con el empleo del reactivo LAL. Inicialmente este método era poco empleado debido probablemente a la carencia de equipos capaces de manipular varias muestras al mismo tiempo. Se necesitaron varias modificaciones con la finalidad de simplificarlo y elevar su sentido práctico:

- 1) el empleo de un lector de microplacas de alta resolución dotado de un incubador a 37 °C,
- 2) el uso de un software acoplado mediante una interfase a una computadora para la adquisición y procesamiento de los datos y,
- 3) la disponibilidad de una formulación del lisado o reactivo LAL más sensible.

El método turbidimétrico cinético posee el más amplio rango de detección entre los métodos conocidos (0,00-100 UE/mL). Su principal desventaja es que requiere de un equipamiento costoso y de un personal lo suficientemente calificado para el manejo de equipos y el procesamiento de los datos.

- Métodos cromogénicos.

La primera aplicación del método cromogénico del LAL fue descrita por Nakamura y otros en 1977. A partir de aquí han aparecido muchas versiones, por lo que el método cromogénico posee las diferencias más notables en cuanto a los procedimientos descritos entre los distintos fabricantes. La compañía japonesa Seikagaku Kogyo Corp. fue la primera en vender el método cromogénico del LAL a inicios de la década de los 80.

Estos métodos se fundamentan en el empleo de un sustrato cromogénico sintético incoloro. El sustrato está compuesto por un pequeño péptido unido por la arginina C-terminal a una molécula del cromóforo p-nitroanilina (pNA). Una vez activada la cascada del LAL, la enzima coaguladora provoca la liberación de la molécula de pNA de color amarillo. El desarrollo de la coloración amarilla es proporcional a la concentración de endotoxinas en la muestra.

Estos métodos han sido empleados especialmente para la cuantificación de endotoxinas en muestra de plasma, sangre y otros fluidos biológicos. Al igual que los métodos turbidimétricos, el equipamiento que requiere es costoso pero de uso variado en el laboratorio. El sustrato cromogénico es el componente más caro e inestable del kit. Cuenta con 2 versiones de punto final y una cinética.

El uso de sustratos cromogénicos, comparando con el método de gelificación, disminuye el tiempo del ensayo, elimina la posible destrucción accidental del gel durante la incubación o la lectura, y permite una mayor capacidad de procesamiento de muestras.

- Método cromogénico cinético:

El principio de este método es muy similar al turbidimétrico cinético, solo que en este caso mide el desarrollo de color en el tiempo. El rango de detección para la cuantificación de endotoxinas es de 0,005-50 UE/mL. Es importante distinguir entre el ensayo pseudocinético y el cinético verdadero. El primero es de 2 pasos. Se sigue el desarrollo de color después de la adición del sustrato

cromogénico a una reacción terminada entre la endotoxina y el reactivo LAL, mientras que el cinético verdadero es de un solo paso. En general, este método no reporta ventajas significativas sobre el turbidimétrico cinético. En el mercado se oferta un método cromogénico que requiere un solo paso de incubación adaptable tanto para el método cinético verdadero como para el de punto final.

- Método cromogénico de punto final:

Este ensayo puede desarrollarse en microplacas de 96 pozuelos o en tubos de ensayos; en el último se requiere el doble del volumen de reactivos. En dependencia del fabricante se puede correr en 1 ó 2 pasos de incubación. Por ejemplo, el kit QCL-1000 de BioWhittaker emplea 2 etapas, el primero se incuban a 37 °C la muestra con el reactivo LAL, luego añaden el sustrato cromogénico y vuelven a incubar a 37 °C; en cambio, el kit Pyrochrome de Associates of Cape Cod, Inc. emplea un solo paso, la muestra se incuba con la mezcla LAL/sustrato que vienen co-liofilizados en el kit.

En ambos casos, la reacción puede leerse inmediatamente después de concluida la incubación o puede detenerse mediante la adición de una solución ácida. Hay ventajas y desventajas para cada opción. La adición de la solución ácida elimina cualquier turbidez, disminuye ligeramente la densidad óptica (DO) y puede mejorar la reproducibilidad. Cuando se corre el método en tubos de ensayos, la adición de ácido reduce aun más la DO por dilución. No obstante, se debe emplear la solución ácida en el método en tubos debido al tiempo que toma la transferencia de las soluciones a las cubetas para la lectura. En el lector de microplacas no se observa disminución de la DO debido a que el paso de luz aumenta proporcionalmente con la dilución.

De forma muy casual, este método puede desarrollarse con fines cualitativos, leyendo las muestras visualmente sin la necesidad de un espectrofotómetro (método en tubos) o un lector de microplacas de 96 pocillos (método en

microplacas). Este abordaje suele ser provechoso cuando es alto el contenido de endotoxinas en la muestra.

El otro método cromogénico de punto final, también conocido como opción diazo, es realmente una extensión del resultado del punto final de la pNA. La pNA libre se derivatiza para formar un diazocompuesto coloreado. El derivado de color magenta brillante conocido como "colorante azo", presenta un espectro de absorción diferente con un pico de absorbancia máxima a 540 nm y un alto coeficiente de extinción. Su principal ventaja reside en que es posible evitar interferencias producidas por muestras de color amarillo, por ejemplo, fluidos corporales y algunos medios para el cultivo de células. Esta opción no es aplicable al modo cinético. (2)

3.4.5 Estándar de Endotoxinas

La prueba de pirógenos no utiliza estándares, pero una vez que se comenzó a usar la prueba LAL, fue necesario emplear uno.

El primer estándar de endotoxinas fue preparado a partir de *Escherichia coli* O113: H10: K por la FDA.

3.4.5.1 Estándar Primario - Estándar de Endotoxinas (RSE)*:

Es el estándar de referencia de la USP, es un liofilizado de Endotoxinas de *Escherichia coli* (O113: H10) que tiene una potencia de 10 000 unidades de endotoxina (UE) por vial.

*RSE: Reference Standard Endotoxin.

3.4.5.2 Estándares Secundarios - Estándar de Endotoxinas (CSE):

El Control estándar de Endotoxinas (CSE o CEE) es una preparación de endotoxinas diferente al RSE cuya relación de actividad debe ser declarada por

el fabricante. La sensibilidad del RSE y del CSE debe ser evaluada en paralelo para encontrar la relación de actividad y usarse como estándar secundario.

En la práctica, se emplean estándares secundarios ofrecidos por las casas que lo manufacturan (Associates of Cape cod, Charles River Endosafe, etc) los cuales han sido estandarizados contra el Estándar USP.

Este estándar puede emplearse hasta un mes después de su reconstitución, debe tener rotulado la fecha de reconstitución y guardarse bien tapado a una temperatura de 2 a 8° C. (21)

Los proveedores del CSE y del reactivo LAL deben garantizar sus resultados a través de un certificado que documente la equivalencia del CSE al estándar USP.

3.4.6 Límites de endotoxina

El límite de endotoxinas para seres humanos esta determinado como 5 unidades de endotoxinas por kilogramo de peso por hora para productos parenterales ($K = 5 \text{ UE / kg}$). Para la vía intratecal el límite es 0,2 UE/Kg/hr, el límite para volúmenes grandes de parenterales es de 0,5 UE/mL. (21)

La Guía de la FDA establece la dosis máxima de producto que puede administrarse y el límite de endotoxinas para cada fármaco. Estos límites han sido calculados considerando un peso promedio 70 Kilos, y la dosis máxima de producto a ser administrado. (21)

Los límites de endotoxinas por producto también están dados en las Farmacopeas para realizar los cálculos respectivos, se aplican a productos terminados y también a materias primas.

3.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. (13)

La Norma COVENIN-ISO 9000:2000 define a la validación como:

“La confirmación por examen y el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos particulares para una utilización o aplicación específica prevista”.

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado. (28)

La validación de un método es un requisito primordial cuando deseamos obtener resultados técnicamente válidos, exactos y confiables. Sin embargo, el conocimiento de la importancia de la validación, de porqué debe hacerse, cuándo debe hacerse, y saber exactamente lo que necesita realizarse, parece ser poco claro. A continuación se presenta de forma breve y concisa la respuesta a estas incógnitas

¿Qué se valida?

- Procesos:

Fundamentalmente aquellos evaluados como críticos, es decir, que puedan causar variación en la calidad del medicamento, así como los procedimientos de limpieza donde pudiera existir contaminación cruzada.

- Métodos analíticos:

Todos los necesarios para el control del proceso y el control de la calidad.

- Equipos y Sistemas ingenieros:

Todos aquellos que son de importancia crucial en los procesos identificados como críticos y en los métodos de ensayos necesarios para el control de proceso y control de la calidad, ya que es aquí donde se realizan mediciones importantes teniendo en cuenta que estos determinan o inciden en la calidad del producto.

¿Por qué se valida?

Se valida porque se necesita:

- Procesos:

Demostrar que los procesos determinados para el estudio, funcionan uniformemente, según lo previsto, cumpliendo las especificaciones determinadas con anterioridad en cada una de las etapas del procedimiento, en condiciones normales de operación a fin de comprobar que están bajo control.

- Métodos analíticos:

Demostrar que el método de ensayo es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos, proporcionando así un alto grado de confianza y seguridad en el método y la calidad de los resultados.

- Equipos y Sistemas ingenieros:

Asegurar que tal como se han instalado se ajustan al diseño aprobado y a las recomendaciones del fabricante y además cumplen con las especificaciones de compra; operan de acuerdo con las especificaciones determinadas con anterioridad y funcionan según el uso previsto en condiciones normales de operación.

¿Cuándo se valida?

Se validan cuando se presentan situaciones como:

- Procesos:

Desarrollo de nuevos procesos, modificaciones del proceso, surgimiento de problemas en el proceso, cambios en los equipos o los sistemas que intervienen en el proceso, cambios en los locales donde se llevan a cabo los procesos

- Métodos analíticos:

Cambios en el método sin importar cuán pequeños sean, uso de nuevas sustancias químicas, uso de nuevos instrumentos, que se realicen en nuevas instalaciones, que lo realice un analista distinto al que comúnmente lo hace, que sea desarrollado internamente en el laboratorio.

- Equipos y Sistemas ingenieros:

La instalación, modificación o cambio de ubicación del equipo o sistema en cuestión, la instalación, modificación, sustitución o cambio de ubicación, de cualquier componente del sistema o equipo, surgimiento de problemas en el proceso y forme parte del estudio de las causas que originan el problema, reparación de los mismos, cambios en los operarios que normalmente lo operan, sospecha de un proceso de medición con resultados incorrectos, pérdida de las características metrológicas previstas inicialmente.

¿Dónde se valida?

La validación se realiza:

- Procesos:

En el lugar donde normalmente se llevarán a cabo los mismos, en este caso, en los talleres de producción donde se desarrollan los subprocesos determinados para el estudio.

- Métodos analíticos:

En el lugar donde normalmente se llevarán a cabo los mismos, los correspondientes a la evaluación del producto intermedio y demás necesarios para el control de proceso, los correspondientes a materias primas y producto final en el laboratorio de Control de la Calidad.

- Equipos y Sistemas ingenieros:

En el lugar donde normalmente operan los mismos durante su uso en los respectivos procesos o durante la realización de un método de ensayo, según sea el caso.

¿Quién valida?

Validan *procesos, métodos analíticos, equipos y sistemas ingenieros* las personas que normalmente los llevan cabo y operan según sea el caso.

¿Cómo se valida?

Se valida:

- Procesos:

Evidenciando que el proceso está bajo control estadístico en cuanto a tendencia central y variabilidad y evaluando el cumplimiento de las especificaciones en cada una de las etapas del proceso, al menos tres veces consecutivas. En este caso:

- Se colocan los puntos correspondientes a los resultados de la característica de calidad pureza en las cartas de control establecidas para el control de proceso y se evalúa el comportamiento de estos puntos para comprobar de que no existe señal alguna de cambio especial en el proceso, es decir, no existen causas atribuibles que afecten el correcto funcionamiento del mismo.

- Se evalúa el cumplimiento de las especificaciones en cada una de las etapas del proceso a validar.

- Métodos analíticos:

Evaluando la capacidad del método analítico de conservar a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación, es decir su fiabilidad, a través de diferentes parámetros de validación; tales como: linealidad, precisión, exactitud, especificidad/selectividad, etc. Para la evaluación de los criterios de validación se tendrá en cuenta dos aspectos:

- El tipo de método de ensayo
- El grado de validación externa que posee

- Equipos y Sistemas ingenieros:

Asegurando que estos cumplan las especificaciones de compra y la información escrita proporcionada por el fabricante (Cualificación de la instalación). Determinando que operen de acuerdo a las especificaciones y registrando toda la información y datos pertinentes para demostrar que funcionan según lo previsto (Cualificación operativa) Determinando que operen según lo previsto haciéndolos funcionar repetidamente y registrando toda la información y datos pertinentes. En el caso de los equipos, se debe ejecutar el procedimiento de trabajo normalmente tres veces para cada uso, para los sistemas se debe poner a funcionar estos, por veinte días laborales consecutivos (Cualificación funcional).

3.5.1 Tipos de validación.

- Validación Prospectiva:

Validación conducida antes de la distribución de un producto nuevo, o producto hecho bajo un proceso de fabricación revisado, donde las revisiones pueden afectar las características del producto. Se basa en el análisis de datos obtenidos del diseño y desarrollo de métodos nuevos.

- Validación Retrospectiva:

Validación de un proceso para un producto ya en distribución basada en datos acumulados de producción, de prueba y de control que se tienen documentados. Utiliza todos los resultados de los análisis y controles dentro del proceso.

- Validación concurrente:

Aplicada a pequeños cambios, revalidaciones o en procesos que no han sido validados pero son utilizados normalmente como técnica de análisis. También se aplica en los casos de nuevos fabricantes de principios activos.

- Revalidación:

Cuando se repite parcial o totalmente una validación debido a que se han realizado cambios o se han suprimido partes del método y esto puede afectar la bondad del método validado.

3.5.2 Características analíticas usadas en la validación de métodos

Se puede interpretar la validación del método de ensayo como el proceso de definir un requisito (por ejemplo un requisito analítico) y confirmar que el método de ensayo bajo consideración tiene capacidades de desempeño consistentes

con lo que la aplicación requiere. Por consiguiente, como algo implícito, es necesario evaluar la capacidad de desempeño del método.

También, está implícito en el proceso de validación del método que los estudios para determinar los parámetros de desempeño del método son llevados a cabo utilizando equipos que están trabajando correctamente dentro su especificación y adecuadamente calibrados. Igualmente, el analista que lleva a cabo los estudios debe ser competente y tener conocimiento suficiente en el campo de trabajo, lo que le facilita poder tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones realizadas o de los progresos del estudio.

La validación del método es necesaria ya que permite conocer los parámetros de desempeño del método y proporcionar un alto grado de confianza y seguridad en el método y en los resultados que se obtienen al aplicarlo.

Según las especificaciones proporcionadas por la USP, se establecen cuatro categorías para la validación de procedimientos, las cuales dictan diferentes características de validación para cada ensayo en particular, las cuales son:

- Categoría I:

Para métodos analíticos de cuantificación de componentes mayores o sustancias, drogas a granel o ingredientes activos incluyendo preservantes, en productos farmacéuticos terminados.

- Categoría II:

Para métodos analíticos para determinación de impurezas en sustancias, drogas a granel o en compuestos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos y pruebas límite.

- Categoría III: métodos analíticos para determinación de características de funcionamiento, por ejemplo, disolución, liberación, etc.

- Categoría IV: incluye todas las pruebas de identificación.

Los parámetros requeridos para la validación de métodos analíticos por la USP 32 se presentan en la tabla N° 2

Tabla N° 2. Parámetros requeridos para validación según USP 32

Características de Desempeño analítico	Categoría I de valoración	Categoría II de valoración		Categoría III de valoración	Categoría IV de valoración
		Prueba de límite Cuant.	Prueba de límite Cualitativa		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuant.	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Más sin embargo como se mencionó anteriormente las características analíticas de desempeño del método gel - clot para determinación de endotoxinas bacterianas no son las planteadas por la USP 32 para métodos analíticos ya

que este método es netamente microbiológico y difiere de muchos otros (en los que se pueden obtener resultados numéricos aplicables a características como linealidad, exactitud etc.) en que este reporta resultados semicuantitativos, es decir, resultados positivos y negativos en la mayoría de sus resultados a excepción de los que se extraen de la prueba de confirmación de sensibilidad del reactivo LAL.

La guía de validación del método LAL de la FDA (Ver anexo N°2) ⁽²¹⁾ establece los criterios necesarios para llevar a cabo este proceso, así la validación de la prueba del LAL como una prueba de endotoxina incluye lo siguiente:

- 1) la cualificación inicial del laboratorio, y
- 2) las pruebas de inhibición y realce.

1. Cualificación inicial del laboratorio

Distintas metodologías se han descrito para la detección de endotoxinas, utilizando lisado de amebocitos de *Limulus*, en la actualidad existen disponible en el mercado diversos métodos como el coágulo de gel, cromogénico, las técnicas de punto final turbidimétrico o cinético. Otros métodos que han sido reportados muestran el potencial para aumentar aún más la sensibilidad del método del LAL.

Se debe plantear las características requeridas para desarrollar el método elegido en cuanto a material y equipo planteándolas en el protocolo; verificándolas y comprobándolas previamente a los ensayos.

Se debe evaluar la variabilidad de las pruebas de laboratorio antes que las pruebas oficiales se lleven a cabo, es decir, realizar una estandarización del método y confirmar la sensibilidad del reactivo LAL. Cada analista debe utilizar un solo lote de LAL y un lote único de endotoxina para realizar la prueba de

confirmación de la sensibilidad del reactivo LAL etiquetado, que para el método gel clot es el que se describe en la prueba oficializada por la Farmacopea de los Estados Unidos.

2. Ensayo de inhibición y realce

El grado de inhibición o realce que muchos productos presentan al procedimiento de LAL se determina, para cada formulación de drogas antes de la prueba del LAL que se utiliza para evaluar el contenido de endotoxina de cualquier droga. Todas las pruebas de validación se deben realizar en el producto sin diluir o en una dilución adecuada, las diluciones no deben exceder la Máxima Dilución Válida (MDV).

Por lo menos tres lotes de producción de cada producto acabado que deben ser probados para la inhibición y realce.

Para la técnica gel – clot la prueba de inhibición / realce debe llevarse a cabo de acuerdo con las instrucciones en el apartado 85 de la USP para la prueba de endotoxinas bacterianas, en las pruebas preparatorias (ver Anexo N°3) y tal como se presentara posteriormente en la metodología.

3.5.3 Documentación de la validación

Todas las actividades de validación deben estar planificadas. Los elementos clave del programa de validación se definen y documentan con claridad en un plan maestro de validación (PMV) o documentos equivalentes.

3.5.3.1 Plan Maestro de Validación

El PMV de validación es un documento resumido, es decir, breve, conciso y claro a cargo de la institución debido a la complejidad, responsabilidad y

confidencialidad que el mismo representa. Debe contener, como mínimo, datos sobre los siguientes aspectos:

- Política de validación.

Lineamientos a seguir para desarrollar el estudio de validación.

- Alcance del proyecto.

- ubicación tiempo y espacio.

- Planificación y calendario.

- Procedimientos de validación

- Estructura organizativa de las actividades de validación.

- Resumen de instalaciones, sistemas, equipos y procesos que se deben validar.

- Características específicas brevemente resumidas.

- Consideraciones específicas del proceso.

- Descripción del proceso.

- Atributos del personal.

- Referencias cruzadas a los documentos.

- Responsabilidades

- Preparación del PMV

- Preparación de protocolos y POE'S.

- Trabajo de validación.

- Preparación y control de los documentos.

- Aprobación / autorización de los protocolos e informes en todas las etapas del proceso de validación.

- Formatos para la documentación: el formato que se emplea para los protocolos e informes.

- Control de cambios.

Procedimiento formal que describe las acciones que se deben realizar si se propone cualquier cambio o modificación después de haberse efectuado la validación inicial.

Cuando se trate de proyectos grandes, puede ser necesario crear planes maestros de validación independientes.

3.5.3.2 Protocolo de Validación.

Se elaborará un protocolo por escrito en el que se especifique el método de validación. Este protocolo deberá ser revisado y aprobado previamente a su empleo.

Además, deberá especificar las etapas fundamentales y los criterios de aceptación.

Los posibles pasos para una validación completa del método de ensayo se enumeran a continuación:

- Desarrollar un procedimiento de validación.
- Definir la aplicación, propósito y alcance del método.
- Definir los parámetros de desempeño y criterios de aceptación.
- Definir los experimentos de validación.
- Verificar las características pertinentes de los equipos.
- Cualificar materiales; por ejemplo patrones y reactivos.
- Realizar experimentos de prevalidación.
- Ajustar los parámetros del método y criterios de aceptación, si es necesario.
- Realizar completamente los experimentos internos (y externos) de validación.

- Desarrollar un procedimiento normalizado de operación para ejecutar el método rutinariamente.
- Definir los criterios para la revalidación.
- Definir el tipo y la frecuencia de las pruebas apropiadas del sistema y las comprobaciones del control de la calidad para la rutina.
- Documentar los experimentos de validación y los resultados en un informe de validación. (24)

3.5.3.3 Informe y certificado de validación.

Se preparará un informe con referencias a los protocolos de validación, que resumirá los resultados obtenidos, comentará las desviaciones observadas y extraerá las conclusiones pertinentes, incluyendo recomendaciones sobre los cambios necesarios para corregir las deficiencias.

Todo cambio en el plan tal como se ha definido en el protocolo deberá documentarse con la justificación correspondiente.

El informe de validación debe incluir por lo menos la siguiente información:

- Propósito.
- Alcance.
- Documentos de referencia.
- Responsabilidades.
- Procedimiento.
- Datos obtenidos en la validación.
- Análisis de datos.
- Conclusiones.
- Recomendaciones.
- Anexos: datos crudos de validación.

Una vez llevada a cabo una validación satisfactoria, se efectuará una aprobación formal para la siguiente fase de validación en forma de autorización por escrito denominada **certificado de validación**, que deberá adjuntarse al informe de validación.

Para que la comprensión de las etapas de un proceso de validación sea mas clara se presenta una Metodología General de validación en la figura 7; en ella se aplica la teoría ideada por Deming "Planificar-Hacer-Verificar-Actuar" (PHVA), lo que garantiza un mejoramiento continuo del sistema de validación diseñado; relacionado con requisitos del Sistema de Gestión de Calidad (SGC) de la norma ISO 9001. (18)

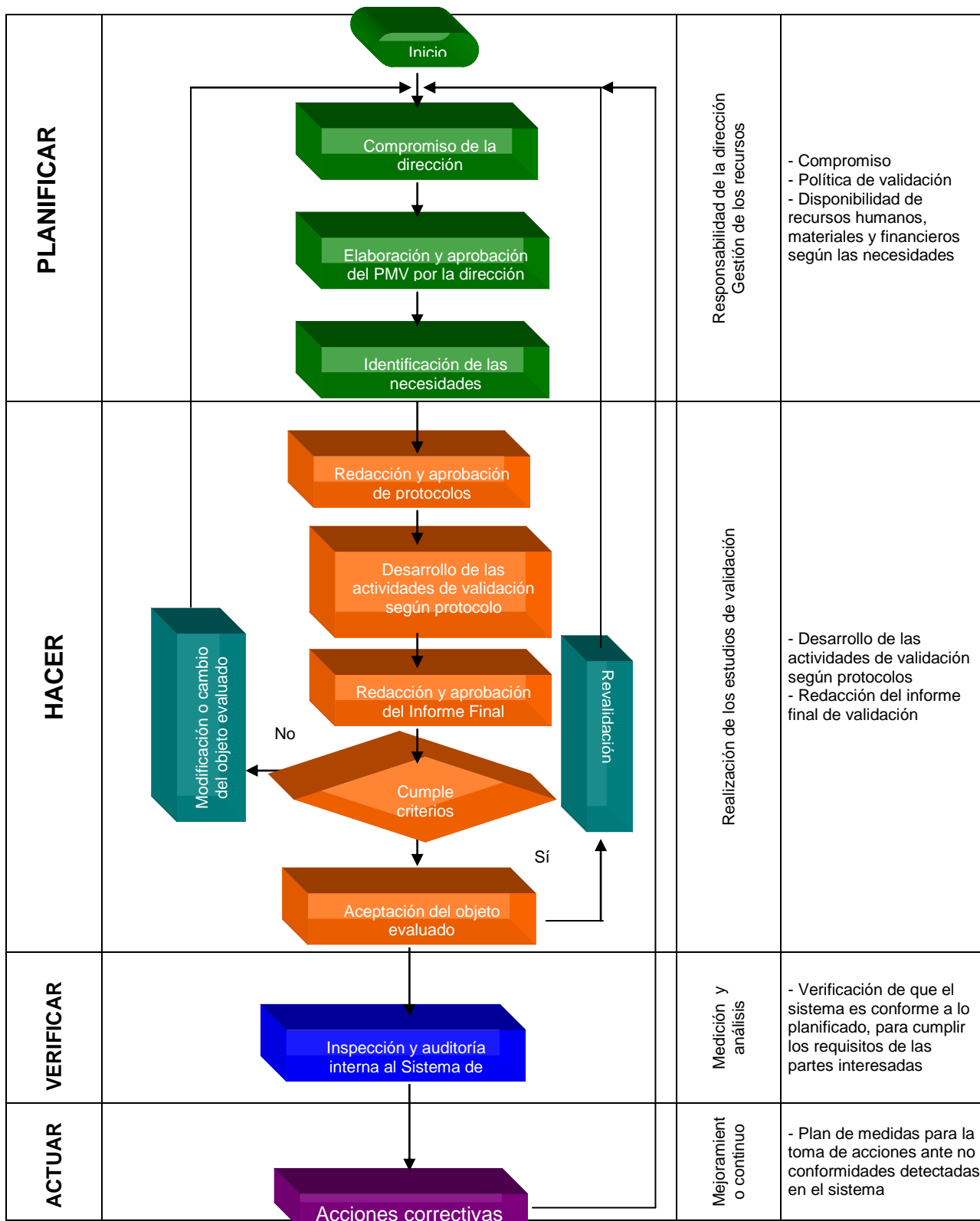


Figura N°7— Metodología General del Sistema de validación

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio:

La investigación fué de tipo bibliográfico, descriptivo y experimental.

- I. Bibliográfico: porque el proceso de investigación se basó y fundamentó en las metodologías de análisis estipuladas en la farmacopea de los Estados Unidos 32 en su apartado general <85> y en la guía de validación de la prueba LAL de la FDA. (Ver anexos N°2 y N°3)
- II. Descriptivo: porque se detalló el fundamento, el protocolo de análisis de endotoxina bacteriana por el método de gel – clot, el informe de validación y el certificado de validación para el producto Furosemida (20 mg) inyectable.
- III. Experimental: porque se realizó el proceso de estandarización y validación del método de análisis de endotoxina bacteriana de manera experimental en las instalaciones de laboratorio de Control de Calidad Microbiológica de Medicamentos de un laboratorio nacional certificado.

4.2 Investigación bibliográfica.

Se realizó una investigación en las universidades que ofrecen la Licenciatura en Química y Farmacia; Universidad de El Salvador, Universidad Alberto Masferrer y Universidad Nueva San Salvador específicamente en las bibliotecas de sus respectivas facultades, encontrándose únicamente una tesis relacionada a la determinación de pirógenos en inyectables de la industria farmacéutica nacional (5), en la biblioteca de la facultad de Química y Farmacia “Dr. Benjamin Orozco” de la Universidad de El Salvador. Además se encontraron libros

oficiales en diferentes ediciones que plantean la metodología analítica para la realización de la prueba de endotoxinas bacterianas en productos farmacéuticos de uso humano, veterinario e insumos médicos (USP 28 y otras), así como libros de microbiología general en las bibliotecas de las facultades de química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y Universidad Alberto Masferrer.

Además se realizaron consultas a Internet.

4.3 Investigación de campo

Universo y muestra:

4.3.1 El universo de esa investigación fueron los productos Furosemida (20 mg) inyectable que la industria farmacéutica produce y que está a disposición en el mercado nacional.

4.3.2 La muestra fue puntual debido a que se trabajó específicamente con las muestras producidas por Laboratorio Paill S.A de C.V.

El método de muestreo fue recolectar 3 muestras de inicio y 3 muestras de final de producción, por cada uno de tres lotes de dicho producto para cada analista que realice el ensayo.

- Métodos, técnicas e instrumentos

El método de análisis de endotoxina bacteriana fue el método gel – clot presentado como método oficial en la USP 32 (Ver anexo N° 3) para la prueba de endotoxinas bacterianas en productos farmacéuticos de uso humano y veterinarios e insumos médicos.

Los análisis se realizarán en los laboratorios de control de calidad microbiológica de un laboratorio nacional certificado, institución que proporcionará los reactivos, materiales y equipo necesario para la realización de la prueba.

Como instrumento de recolección de datos se utilizaron cuadros que permitieron un análisis claro de los resultados bajo el siguiente formato o bajo uno que se acople mejor para dicho fin. (Ver anexo N°4)

4.4 Parte experimental

4.4.1 Revisión del plan maestro de validación ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁶⁾

El PMV es la planificación formalizada para realizar los estudios de validación. Antes de empezar el proceso de validación se reviso y estudio el PMV para recopilar todos los elementos necesarios e implicados en el proceso de validación tales como formatos de protocolos, inform2es, comité de validación, política de validación, alcance etc. Este documento esta bajo el cargo del área 2de aseguramiento de calidad y del área de control de calidad del laboratorio en el que realizará la validación del método, por lo que la revisión del mismo se realizo previa autorización y bajo la supervisión de las áreas competentes.

4.4.2 Elaboración del protocolo de validación ⁽¹⁰⁾ ⁽¹³⁾ ⁽¹⁷⁾

Es el documento que indica cómo se realizará la validación, incluyendo parámetros de prueba, características de producto, equipo de fabricación, y puntos de decisión en lo que constituye un resultado de prueba aceptable.

El protocolo de validación especificó la siguiente información y se desarrollo bajo el siguiente formato:

- Título

"Validación del método de análisis"

- Justificación del método

Justifico la elección del método en comparación a otros, enuncia ventajas y desventajas comparativas.

- El propósito y el alcance

Estableció el propósito de la validación en términos de evidenciar la calidad del producto, entre otros; además se estableció el alcance que se obtendrá de la misma.

- Responsabilidades y competencias del equipo de trabajo

Describió quienes son los responsables de ejecutar el procedimiento de validación, la formación del equipo de trabajo y las competencias respectivas.

- Cualificación del equipo

Incluyó las características mínimas que debe tener el instrumental para el desarrollo del método y la prueba de que el equipo que se usará cumple con todos los requisitos.

- Cualificación del funcionamiento instrumental

Debe demostrarse en esta sección que los instrumentos que se han utilizado en la validación del método funcionan correctamente y por lo tanto los resultados son fiables.

- Marca, modelo y manual del fabricante

- Modificaciones

- Calificación de la instalación y de la operación

- Programas de calibración
- Cronogramas de mantenimiento

- Validación del método analítico

- Descripción del método de muestreo.

Se desarrollaron las instrucciones precisas de cómo realizar el muestreo, el tipo de muestreo y los elementos y referencias para realizarlo.

- Parámetros analíticos a estudiar

Se plantearon las características de desempeño que se evaluarían y el Procedimiento para evaluarlas; experimentos para cada parámetro. Además de la base de elección de los mismos.

- Descripción del método analítico.

Se describió del método de forma que pueda ser seguido por un analista que no tenga entrenamiento especial en este método analítico.

- Reactivos y solventes.

Lista de materiales y equipos

- Procedimientos

Método de ensayo normalizado y documentado.

- Cálculos. Análisis estadístico o fórmulas

- Criterios de aceptación.

Criterio de aceptación para cada parámetro de desempeño (los criterios de aceptación no pueden ser cambiados para ajustarse a los datos) establecidos.

- Estudio de los resultados.

Se describió un formato de recolección de datos crudos de validación, con referencia a los parámetros fijados en b) y siguiendo el procedimiento descrito en e) y comparándolos con los criterios fijados en H.

- Conclusiones.

Se decidió según los resultados obtenidos en el numeral anterior, si el método es válido o si por el contrario no reúne todos los requisitos necesarios.

- Certificado de validación.

Es el documento que prueba que el método ha sido validado, cumpliendo todos los criterios de aceptación que previamente le han sido exigidos. Fue firmado por el equipo de validación y el comité de validación.

4.4.3 Lineamientos de la USP 32 sobre material y reactivos ⁽¹¹⁾

4.4.3.1 Material.

Todo el material empleado en la prueba, debió estar libre de endotoxinas. Para material de vidrio, se utilizaron ciclos de esterilización/despirogenización con calor seco a una temperatura de al menos 250°C.

4.4.3.2 Preparación de reactivos:

Todas las operaciones de la prueba se llevaron a cabo en condiciones asépticas, para evitar cualquier contaminación bacteriana. Se reconstituyeron los reactivos solo al momento de ser utilizados.

- Control estándar de endotoxina (CEE):

Se reconstituyo con el volumen de agua reactivo LAL indicado en el membrete, se agitó vigorosamente sin interrupción en un agitador tipo vortex durante 1 minuto por intervalos de 30 - 60 minutos.

Se utilizo esta solución concentrada para preparar las diluciones seriadas adecuadas, conservar entre 2-8 °C por no más de 14 días.

Para realizar las diluciones subsecuentes se dejo que la solución concentrada alcance una temperatura de 20-25 °C y se agito vigorosamente por lo menos durante 3 minutos antes de usarse. Cada dilución debe agitarse por lo menos durante 30 segundos antes de continuar con la siguiente dilución. No conservar las diluciones, debido a que hay pérdidas de actividad por absorción, a menos que existan datos que soporten lo contrario.

- Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL).

Se reconstituyo con el volumen de agua reactivo LAL indicado en el membrete. Se mezclo suavemente hasta disolución completa. No agitar y evitar la formación de espuma.

4.4.4 Ensayos preliminares según USP 32 y guía de validación FDA (ver anexo N°2 y N°3)

La validez de los resultados obtenidos de la determinación de Endotoxina bacterianas, requieren de una demostración adecuada de que el material de prueba al cual se le aplica este método, no inhibe ni aumenta la reacción, además de no causar otro tipo de interferencia con la prueba, por lo que se realizará la verificación de la sensibilidad del LAL y la prueba de Inhibición y realce, como se describe posteriormente.

La validación debe repetirse si existen cambios en el reactivo LAL o en los procesos de manufactura o formulación del material de prueba.

Se realizarán mínimo 2 ensayos por lote, uno por cada analista. El número de replicas será el que indica la USP para cada fase ensayos.

4.4.4.1 Verificación de la sensibilidad del LAL

Se debe confirmar la sensibilidad del reactivo usando al menos un vial del lote del reactivo LAL.

Empleando un solo lote del CEE, se prepararon series de diluciones de la endotoxina, utilizando un factor de dilución 1:2 para dar concentraciones de 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$. (ver anexo N°5) Donde λ es la sensibilidad declarada en la etiqueta.

Se realizo la prueba de LAL por cuadruplicado utilizando las cuatro concentraciones del CEE y se incluyo un control negativo en cada determinación.

La media geométrica debe ser mayor o igual a 0.5λ y menor o igual a 2λ para confirmar la sensibilidad declarada.

La confirmación del lisado se realiza cada vez que se adquiera un nuevo lote de reactivo LAL y antes de ser usado en la prueba.

Se prepararon los tubos según el procedimiento de preparación de tubos.

Se calculo la media geométrica del punto final de la concentración de endotoxina, en el material de prueba, como se describe en cálculos e interpretación.

Esta prueba no sería válida a menos que las soluciones A y D no muestren en ninguna reacción y el resultado de la solución C confirme la sensibilidad declarada en la etiqueta.

Si la sensibilidad del lisado determinada en presencia de la solución de muestra en análisis de la solución B no es menor de 0.5λ y no es mayor de 2λ , la solución de muestra no contiene factores que interfieran en las condiciones experimentales utilizadas. En caso contrario, la solución de muestra que se va a examinar interfiere con la prueba.

4.4.4.2 Procedimiento general de preparación de tubos.

Mezclar volúmenes iguales (0.1 mL) de cada una de las soluciones preparadas con el reactivo de LAL(0.1 mL) en los tubos y agitar durante no menos de 30 segundos e incubar en baño María a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante $60 \pm 2\text{min}$. Una vez iniciada la incubación evitar vibraciones y mantener en reposo absoluto todos los tubos de prueba.

4.4.4.3 Interpretación de resultados.

Al finalizar el período de incubación, se tomaron cuidadosamente cada tubo y se invirtió lentamente hasta 180° . Un resultado positivo (+) se caracteriza por la formación de un gel firme que mantiene su integridad cuando se invierte el tubo. Un resultado negativo (-), se caracteriza por la ausencia de un gel firme o por la formación de una masa viscosa que no mantiene su integridad cuando se invierte el tubo.

4.4.5 Análisis del producto Furosemida (20 mg) inyectable.

4.4.5.1 Preparación de las soluciones de muestra

Se usaron tres muestras de inicio y final de producción de tres lotes diferentes del mismo producto, se realizó un pool con una muestra de inicio y final para cada serie de análisis. El pH debe encontrarse en el intervalo de 6,0-8,0, o bien al pH especificado en la monografía individual correspondiente.

4.4.5.2 Determinación de la máxima dilución válida (MDV) ⁽¹¹⁾

La MDV es la dilución máxima permitida de una muestra a la que se le puede determinar el límite de endotoxina. Se aplica a soluciones inyectables o soluciones de administración parenteral en la forma reconstituida o diluida para administración. Se calculará la MDV del producto según la siguiente ecuación general:

$$MDV = \frac{\text{(Límite de endotoxina X concentración de la solución de muestra)}}{\lambda}$$

Donde:

λ = sensibilidad del reactivo LAL declarada en la etiqueta.

Dado que:

- El límite de endotoxina para el producto es no más de 3.6 UE/mg
- La concentración de la solución es 20 mg/mL.
- La sensibilidad a utilizar será 0.125 UE/ml.

$$MDV = \frac{(3.6 \text{ UE/mg} \times 20 \text{ mg/mL})}{0.125 \text{ UE/mL}}$$

$$MDV = 576$$

La MDV que se puede utilizar será de 1:512, por factor de dilución 1:2.

4.4.5.3 Prueba de factores de interferencias Inhibición y realce.

Se realizó la prueba en alícuotas del material de prueba y en las diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512 no excediendo la MDV.

Para realizar esta determinación se prepararon las siguientes series de trabajo:

A) Solución de muestra de la preparación en análisis.

Material de prueba y diluciones del material de prueba sin adición de Endotoxina. Por cuadruplicado cada una.

B) Prueba de interferencia.

Material de prueba y diluciones adicionadas de endotoxina y cuyas concentraciones finales deben ser de 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$. Por cuadruplicado

C) Control de sensibilidad declarada en la etiqueta del reactivo LAL.

CEE diluido en agua, cuyas concentraciones finales deben fueron 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$. Por duplicado.

D) Control negativo de agua reactivo para LAL.

Agua reactivo para LAL en igual volumen. Realizar por duplicado

4.4.6 Análisis estadístico de los resultados

4.4.6.1 Cálculos:

La media geométrica de la concentración del punto final es la sensibilidad medida del reactivo LAL (en UE/mL)

Se llama punto final al último punto en el cual se lee un positivo. A este punto final se le calcula el logaritmo. Una vez se tengan los respectivos logaritmos se halla la sumatoria (Σ) y luego el promedio (X).

Con el valor del promedio (X) se calcula el promedio geométrico (GM) de la siguiente forma:

$$GM = \text{antilog. } X$$

La media geométrica debe encontrarse en el intervalo de $0,5\lambda$ a $2,0 \lambda$ (0.5-0.125 UE/mL) para confirmar la sensibilidad declarada en la etiqueta y ser utilizado en las pruebas. (1)

Los resultados fueron presentados en cuadros bajo el formato que se adecuó a la prueba para facilitar su comprensión (ver anexo N°4)

4.4.6.2 Parámetros de desempeño (21)

Los parámetros de desempeño que se estudiaron no son iguales a los definidos por la USP para otros métodos analíticos dado que para este método microbiológico se debe evaluar según la guía de validación de la FDA:

La cualificación del laboratorio (material y equipo) que se realiza durante la elaboración del protocolo de validación

4.4.6.2.1 La sensibilidad del reactivo LAL

Por medio de la prueba de confirmación de sensibilidad empleando las diferentes diluciones de endotoxina para determinar el punto final. Se debe calcular la media geométrica del punto final que debe encontrarse en el intervalo de $0,5\lambda$ a $2,0 \lambda$ para que los resultados sean válidos.

4.4.6.2.2 La prueba de interferencias / inhibición o realce

Se confrontan específicamente los resultados de la solución B , dado que la solución B contiene la confirmación de sensibilidad es decir, el CEE en diferentes diluciones; en la cual se espera la formación de gel por la presencia evidente de endotoxinas. Los resultados solo deben ser positivos en presencia de CEE a una concentración no menor que la sensibilidad declarada en el tubo B para demostrar que la muestra no contiene factores que interfieran en las condiciones experimentales utilizadas.

De esta manera al cumplirse con estas condiciones en ambos parámetros se considerará válido el método de análisis.

Para que el producto bajo análisis se considere libre de endotoxinas debe cumplir en la prueba de límite de coagulación que las soluciones A y D sean negativos y que los tubos B y C sean positivos.

4.4.7 Elaboración del informe de validación

Este documento incluye una síntesis del protocolo de validación del método analítico incluyendo un resumen de los aspectos más relevantes como la descripción del método de análisis, los criterios de aceptación, los parámetros de desempeño, el estudio de los resultados. Se realizó en él una discusión de los resultados mediante la cual se obtuvieron las conclusiones que indicaron si se acepta o se rechaza la validación.

4.4.8 Certificado de validación.

Este es el documento formal de aprobación del proceso de validación, este documento fue firmado por las personas responsables de la validación tales

como lo especifica el protocolo de validación. En este se incluyo un resumen de los resultados obtenidos bajo los parámetros requeridos y se anexó al final del informe de validación (3) (4)

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

5.1 Desarrollo del protocolo de validación para la prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel – Clot del producto Furosemida (20mg) inyectable.”

Se desarrolló el protocolo de validación para la prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel – Clot del producto Furosemida (20mg) inyectable siguiendo los lineamientos planteados en la metodología y ajustándolo a los requerimientos internos de Laboratorios Paill.

A continuación se desarrolla el contenido del protocolo.

- Propósito y alcance:

Se estableció el propósito de desarrollar la validación del método de análisis dentro del laboratorio que es demostrar que el método de ensayo para la detección de endotoxinas bacterianas es el adecuado para producir resultados confiables y seguros durante la ejecución rutinaria del mismo y al mismo tiempo garantizar que el producto cumple la ausencia de endotoxinas como requisito dado por la USP para la fabricación de productos inyectables.

- Justificación del método:

El método gel – clot permite determinar la presencia y concentración de endotoxinas en formas farmacéuticas parenterales, productos biológicos, veterinarios, material médico, materias primas, agua para uso en inyectables, etc. Además de ofrecer como ventajas su rapidez, especificidad, facilidad de realización, requerimientos más sencillos y de menos costos por su utilización de volúmenes mínimos de reactivos y muestras, además de proveer resultados

confiables en corto tiempo, con menor susceptibilidad a la inhibición y alta sensibilidad para la detección de endotoxinas bacterianas.

- Responsabilidades y competencias:

Se estableció que el gerente de Aseguramiento de Calidad del laboratorio sería el área a la que le competiría autorizar el proceso, se formo un equipo que estaría a cargo de la realización de las pruebas, así como de planificar y desarrollar el proceso, la revisión y aprobación de los documentos relacionados, bajo criterios propios del sistema de calidad que se implementa dentro del laboratorio mismo.

- Cualificación de área, equipo y elementos requeridos

Área de validación: área de análisis de esterilidad del laboratorio nacional certificado el cual cuenta con los siguientes requisitos



Figura N°8. Área de análisis de esterilidad del Laboratorio nacional certificado.



Continuación Figura N°8.

Cuadro N°1 Características, requisitos y verificación de requisitos de área de validación.

Característica	Requisito	Verificación de requisito
Temperatura	18 – 23° C	Rango de temperatura de y humedad establecido por el laboratorio según Norma oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, registrado en bitácoras 2 veces al día RPEO-08-5.01-03/00 Ver figura N°9
Humedad Relativa	30 – 60 %	
Limpieza y sanitización de área y equipos	Limpieza de áreas con rotación de desinfectantes de superficies para eliminación eficaz de carga bacteriana en superficies	Realizada según PEO -07-7.04-03/02, con frecuencia de 2 veces por semana.

Continuación Cuadro N°1

Cámara de flujo laminar	Con filtros HEPA de 99.99% eficiencia.	Comprobación de funcionamiento de filtro y condiciones ambientales de área (monitoreo pasivo y activo según requerimientos internos) por monitoreo de partículas viables con muestreador de aire MAS 100 según PEO PEO-07-7.16-01. Ver figura N° 10
Ambiente	Monitoreo ambiental de partículas viables con muestreador de aire MAS 100	

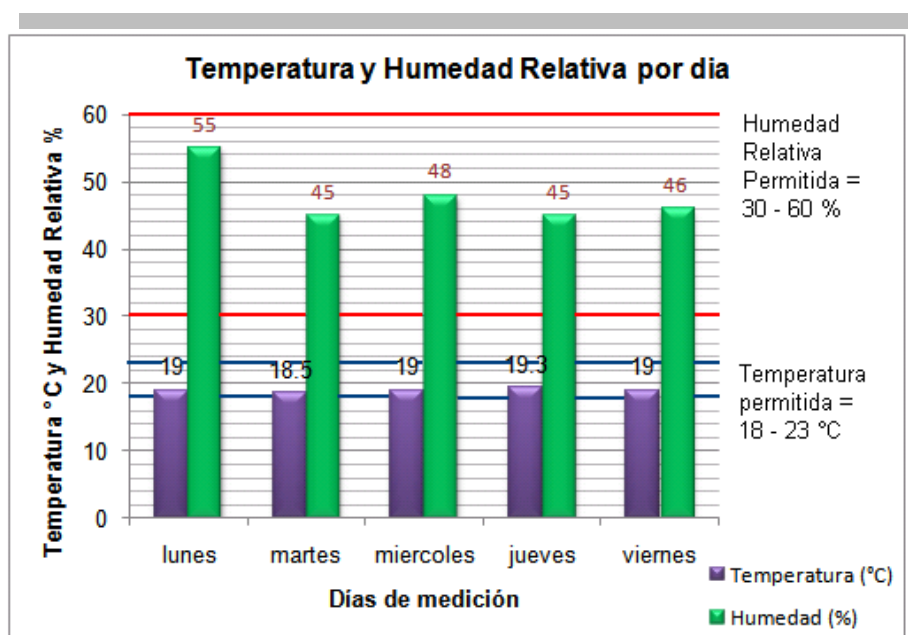


Figura N°9 Medición diaria de Temperatura y Humedad Relativa en área de análisis de validación



Figura N° 10. Equipo muestreador de aire MAS 100 NT

Posterior a verificación de los requerimientos de área se inicio con la verificación del instrumental requerido y las características del mismo.

- Estufa de calor controlado

Capacidad de calentamiento hasta $250 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para efectuar el proceso de despirogenización de material

- Maquina de baño de agua

Capacidad de temperatura de $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para incubación de las series preparadas.

- Termómetro

Rango definido de medición de 100°C mínimo con exactitud de 0.1°C para medición de temperatura de baño de agua.

- Cámara de flujo laminar

Con filtros HEPA de 99.99% eficiencia.

- Cualificación del funcionamiento instrumental:

En vista de la usencia de calificaciones tanto de instalación (IQ) como de operación (OQ) y desempeño (PQ) se recopilo información a través de los registros internos a fin de comprobar el correcto funcionamiento de los mismos.

Una vez definidas las características requeridas en los materiales e instrumentos específicos se procedió a realizar la cualificación de su funcionamiento a través de los registros de calibración, mantenimiento o registros internos a fin de comprobar el correcto funcionamiento de los instrumentos a emplear ya que en ese momento no se contaba con la cualificación de instalación (IQ), calificación de desempeño (PQ) y cualificación de operación (OQ) de los mismos, por las entidades competentes.

Cuadro N°2 Requisitos y verificación de requisitos de equipos e instrumentos implicados en la realización de los ensayos.

Instrumento/ elemento requerido	Requisito	Verificación del requisito
Estufa de calor controlado	Capacidad de calentamiento hasta $250 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para efectuar proceso de despirogenización de material	Ciclo efectuado según PEO-05-5.11-05/17 y bajo un programa de mantenimiento y calibración con trazabilidad a NIST.

Continuación Cuadro N°2

Instrumento/ elemento requerido	Requisito	Verificación del requisito
Maquina de baño de agua	Capacidad de temperatura de $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para incubación de las series preparadas.	Pre calentamiento de baño y estabilización de temperatura con 30 minutos de anticipación como mínimo a la utilización del mismo, registro diario de temperatura de baño en RPEO-05-4.10-04/13.
Termómetro	Rango definido de medición de 100°C mínimo con exactitud de 0.1°C para medición de temperatura de baño de agua.	Ver figura N° 11
Cámara de flujo laminar	Con filtros HEPA de 99.99% eficiencia.	Verificación de funcionamiento de filtro por monitoreo de partículas viables con muestreador de aire MAS 100 según PEO PEO-07-7.16-01.

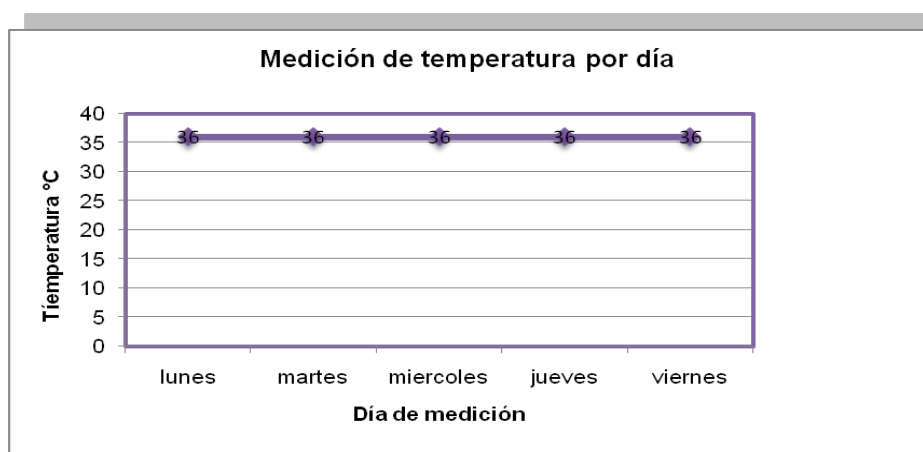


Figura N° 11 Medición diaria de temperatura de baño maría, registros tomados de RPEO-05-4.10-04/13.

- Validación del método

En esta parte se establecieron los puntos fundamentales del proceso:

- Descripción del método de muestreo

El muestreo se realizó bajo los criterios de toma de muestra para análisis microbiológico establecido por el laboratorio realizado por el personal de controles en proceso tomando 3 muestras de inicio y final de producción de cada uno de tres lotes diferentes de producción.

- Parámetros analíticos a estudiar

Los parámetros necesarios para establecer la validez del método según la guía de validación del método de la FDA y la metodología dada por la USP 32; y los cuales fueron tomados en cuenta para realizar dicho proceso son: *demostrar que el reactivo LAL cumpla con la sensibilidad* que declara en su etiqueta y certificado usando por lo menos un vial del lote de reactivo, además de *demostrar que el material de prueba no inhibe ni aumenta la reacción*, ni causa otro tipo de interferencia con la prueba.

- Descripción del método analítico

El fundamento del método que es detectar la presencia de endotoxinas por el incremento de la densidad óptica detectada por la formación de un gel o coágulo insoluble que se desarrolla al combinarse el lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* con las endotoxinas bacterianas bajo condiciones específicas de tiempo y temperatura (1 hora y 37 °C)

- Reactivos y solventes

Previo a una verificación de lotes para la combinación correcta de Control Estándar de Endotoxina y Reactivo LAL especificada en certificados de análisis

del fabricante a fin de obtener una relación de potencia definida entre ambos se eligieron los siguientes lotes de los mismos; de lo contrario no se obtendrían resultados que sustenten el proceso de validación.

- Control Estándar de Endotoxina (CEE) *Escherichia coli* de 0.5 µg/vial; lote: 121 (equivalente a 500 ng/vial). Ver anexo N°6
- Agua grado despirogenada para prueba de pirógenos; lote: 314-3665. Ver anexo N°7
- Reactivo LAL con sensibilidad de 0.125 UE/mL; lote: 510-02-528. Ver anexo N°8

Además se establecieron los materiales requeridos para el desarrollo del proceso tales como: alcohol isopropílico 70% , guantes, jeringas estériles de 1, 5 y 10mL de capacidad, mascarilla desechable, papel absorbente, papel parafilm, reloj, traje estéril, gorro y zapateras, tijeras, balones volumétricos de 10 ml despirogenados y tubos de 10 x 75 mm despirogenado. Los que son ingresados al área respectiva a través de una ventana de aislamiento de materiales denominada “trampa”.

Antes de iniciar con los procedimientos se realizaron los cálculos de Máxima Dilución Valida y las Cascadas de dilución del Estándar de Endotoxina:

La Máxima Dilución Válida (MDV) es la dilución máxima permitida de una muestra a la que se le puede determinar el límite de endotoxina.

Se calculó a partir de la ecuación general:

$$MDV = \frac{\text{(Límite de endotoxina X concentración de la solución de muestra)}}{\lambda}$$

Donde:

λ = sensibilidad del reactivo LAL declarada en la etiqueta y para este caso 0.125 UE/ml.

Concentración de muestra = 20 mg/mL

Limite endotoxina = no más de 3.6 UE/mg de Furosemida

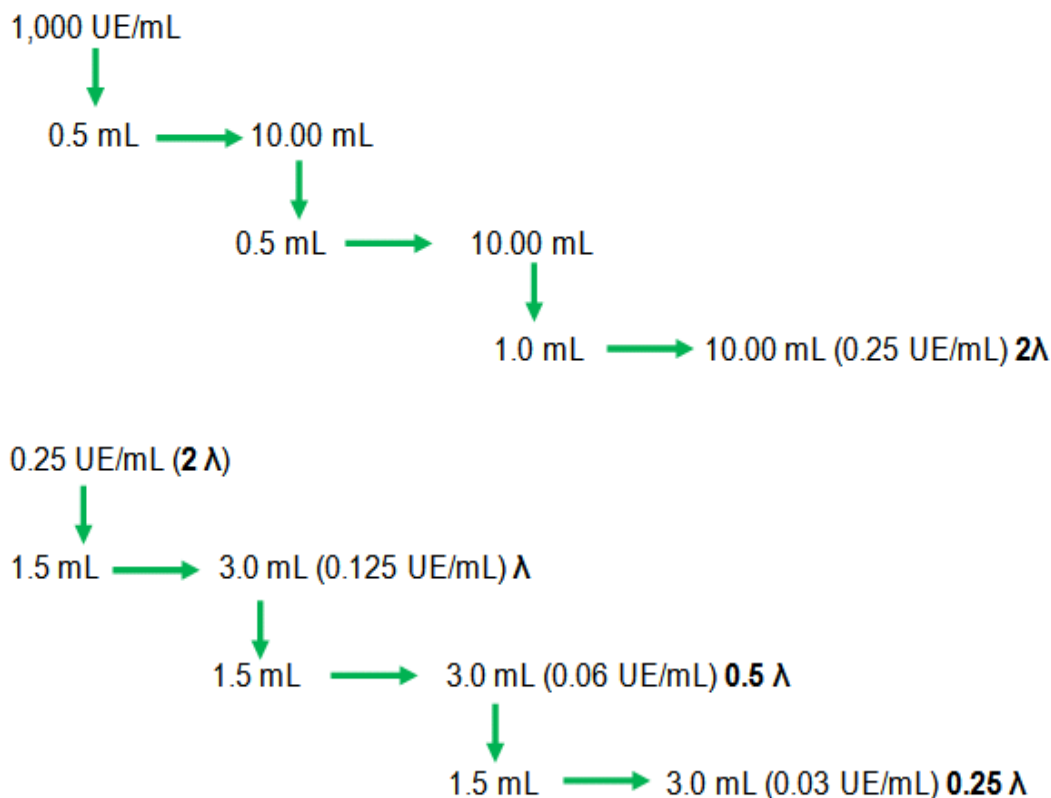
$$\text{MDV} = \frac{(3.6 \text{ UE/mg}) (20 \text{ mg})}{0.125 \text{ UE/ml}} = 576$$

Es decir, se puede utilizar hasta una dilución de 1: 512 por factor de dilución 1:2.

A continuación se efectuó la cascada de diluciones del Control Estándar de Endotoxina.

Cada vial rotula 2,500 UE/vial.

Reconstituido con 2.5 mL para obtener 1,000 UE/ml. Ver anexo N°10



- Verificación de la sensibilidad del LAL

Se debe confirmar la sensibilidad del reactivo usando un vial del lote del reactivo LAL.

Empleando un solo lote del CEE, se prepararán series de diluciones de la endotoxina, utilizando un factor de dilución 1:2 para dar concentraciones de 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$ según la cascada de diluciones antes desarrollada. Donde λ es la sensibilidad declarada en la etiqueta.

Se indicó realizar la prueba de LAL por cuadruplicado para cada una de las cuatro concentraciones del CEE. Incluyendo un control negativo para la determinación.

- Dilución de trabajo

Antes de realizar las pruebas de validación se indicó que se debe proceder a preparar un pool de cada lote de producto, uniendo 1 mL en un tubo apirógeno del contenido de las muestras de inicio y final de producción, esto para los tres lotes de manera individual en sesiones diferentes, por cada uno de los analistas.

Luego se indicó realizar una serie de diluciones de la muestra: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512 que serán las que junto a la muestra sin diluir se trabajaran en la siguiente prueba para encontrar la dilución de trabajo adecuada para emplearse en la prueba de límite de coagulación de la muestra que es la que se ejecuta como ensayo de rutina. Se indicó usar esas diluciones por su facilidad de preparación y porque además se pretende encontrar una dilución de trabajo en la menor dilución posible a fin de no incrementar los gastos en la preparación de una dilución alta para ejecutar el ensayo de rutina.

- Prueba de factores de interferencia

Se indicó preparar las siguientes series de trabajo, que corresponden a la metodología dada por la USP 32:

A) Solución de muestra en análisis.

Muestra directa y serie de diluciones preparadas 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512 (0.1 mL de c/u) sin adición de endotoxina. Realizar por cuadruplicado cada tubo.

B) Prueba de inhibición / realce

Muestra directa y serie de diluciones preparadas 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512 (0.05 mL de c/u) adicionando endotoxina

cuyas concentraciones finales deben ser de 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$ (0.05 mL de c/u). Realizar por cuadruplicado cada tubo. Cada dilución se debe probar con cada concentración de Control Estándar de Endotoxina preparado.

C) Control de sensibilidad declarada en la etiqueta del reactivo LAL o control positivo.

CEE diluido en agua, cuyas concentraciones finales deben de ser 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$. Realizar por duplicado cada tubo.

D) Control negativo de agua reactivo para LAL.

Agua despirogenizada. Realizar por duplicado cada tubo.

Tabla 1. Preparación de Soluciones para la Prueba de Inhibición/Potenciación para Técnicas de Coagulación

Solución	Concentración de Endotoxina/ Solución a la que se Agrega Endotoxina	Diluyente	Factor de Dilución	Concentración Inicial de Endotoxina	Número de Repeticiones
A ^a	ninguna/solución de muestra	—	—	—	4
B ^b	2λ /solución de muestra	solución de muestra	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	$0,5\lambda$	4
			8	$0,25\lambda$	4
			1	2λ	2
C ^c	2λ /agua para BET	Agua Reactivo para LAL	2	1λ	2
			4	$0,5\lambda$	2
			8	$0,25\lambda$	2
			—	—	2
D ^d	ninguna/Agua Reactivo para LAL	—	—	—	2

^a Solución A: una solución de muestra de la preparación en análisis que está exenta de endotoxinas detectables.

^b Solución B: prueba de interferencia.

^c Solución C: control de la sensibilidad declarada en la etiqueta del Reactivo LAL.

^d Solución D: control negativo de Agua Reactivo para LAL.

Figura N° 12 Preparación de soluciones para prueba de interferencias
tomado de Apartado General <85> USP 32

- Procedimiento general de preparación de tubos.

El procedimiento general para llevar a cabo el ensayo es mezclar volúmenes iguales de cada una de las soluciones preparadas (0.1 mL) con el reactivo de LAL en los tubos, taparlos con papel parafilm e incubarlos en baño de agua a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante $60 \pm 2\text{min}$. Una vez iniciada la incubación evitar vibraciones y mantener en reposo absoluto todos los tubos de prueba.

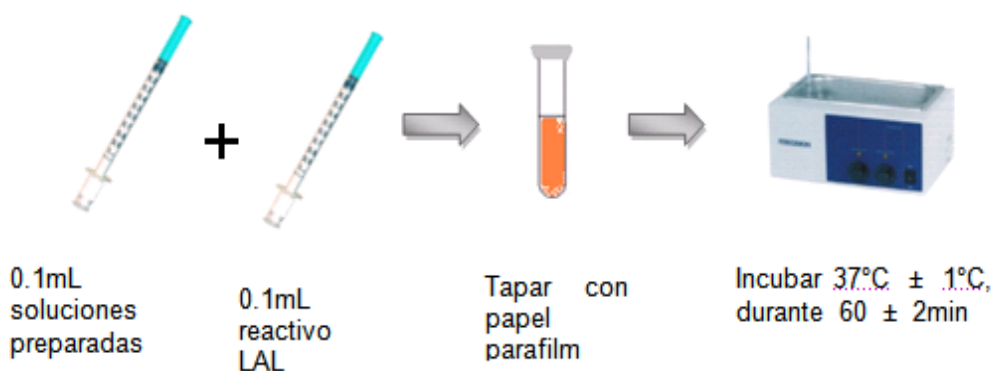


Figura N°13 Procedimiento general de preparación de tubos para ensayo.

- Interpretación de resultados

Se indica la manera adecuada de realizar las lecturas de los tubos una vez transcurrido el tiempo de incubación: tomar cuidadosamente cada tubo e invertirlo lentamente hasta 180°C . Un resultado positivo (+) se caracteriza por la formación de un gel firme que mantiene su integridad cuando se invierte el tubo. Un resultado negativo (-), se caracteriza por la ausencia de un gel firme o por la formación de una masa viscosa que no mantiene su integridad cuando se invierte el tubo.

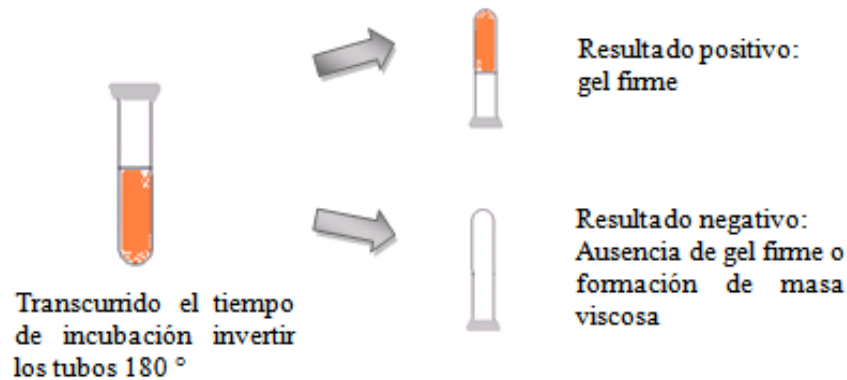


Figura N° 14 Esquema de interpretación de resultados.

- Prueba de límite de coagulación de la muestra

Se indicó preparar las siguientes soluciones por duplicado, tal cual lo indica la metodología de la USP 32

A. Solución de ensayo

Solución de trabajo o muestra directa según el resultado de la prueba de interferencias.

B. Control positivo del material de prueba o interferencias.

Solución de trabajo o muestra directa según el resultado de la prueba de interferencias mas endotoxina, a una concentración de 2λ .

C. Control positivo

Agua desmineralizada.

D. Control negativo de agua reactivo para LAL.

Agua despirogenizada.

Tabla 2. Preparación de Soluciones para la Prueba de Límite de Coagulación

Solución*	Concentración de Endotoxina/Solución a la que se Agrega Endotoxina	Número de Repeticiones
A	ninguna/solución de muestra diluida	2
B	2λ/solución de muestra diluida	2
C	2λ/Agua Reactivo para LAL	2
D	ninguna/Agua Reactivo para LAL	2

* Preparar la Solución A y la Solución B de control positivo del producto utilizando una dilución no mayor que la MDV y tratamientos como se indica en la *Prueba de Factores de Interferencia para las Técnicas de Coagulación en Pruebas Preparatorias para las Técnicas de Coagulación*. Las Soluciones B y C de control positivo contienen la preparación de endotoxina estándar a una concentración que corresponde al doble de la sensibilidad declarada en la etiqueta del Reactivo LAL. La Solución D de control negativo es Agua Reactivo para LAL.

Figura N° 15 Preparación de soluciones para prueba de límite de coagulación tomado de Apartado General <85> USP 32

- Cálculos

Se emplea el cálculo dado por la USP para calcular la sensibilidad del reactivo LAL, determinando el valor medio de los logaritmos de la concentración en el punto final y luego el antilogaritmo del valor medio.

La media geométrica de la concentración del punto final es la sensibilidad medida del reactivo LAL (en UE/mL)

Se llama punto final al último punto en el cual se lee un positivo.

- A este punto final se le calcula el logaritmo.

- Una vez se tengan los respectivos logaritmos se halla la sumatoria (Σ) y luego el promedio (X).

- Con el valor del promedio (\bar{X}) se calcula el promedio geométrico o media geométrica (GM) de la siguiente forma:

$$GM = \text{antilog. } \bar{X}$$

- Criterios de aceptación

Se establecieron los criterios para las pruebas realizadas a fin de tener en cuenta los resultados esperados para dar como válido el método

- Prueba de interferencias

Las soluciones A y D no deben mostrar ninguna reacción y el resultado de la solución C debe confirmar la sensibilidad del reactivo declarada en la etiqueta. Además la sensibilidad del lisado determinada en presencia de la solución de muestra en análisis de la solución B debe estar en el rango de 0.5λ y 2λ para confirmar la sensibilidad declarada en la etiqueta.

- Prueba de Límite de coagulación de la muestra

Ambas determinaciones repetidas de las soluciones B y C deben ser positivas y la solución D debe ser negativa y la preparación en análisis cumple con la prueba si se obtiene un resultado negativo en ambos tubos que contienen la solución A.

- Estudio de los resultados

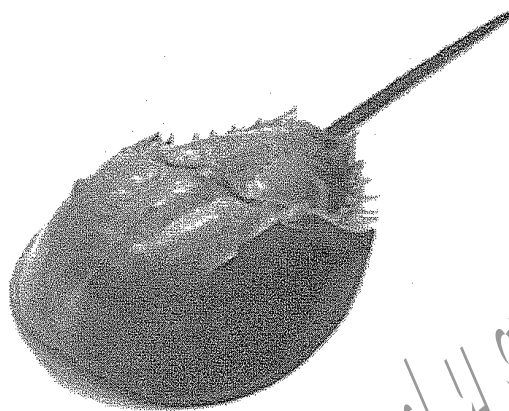
Para el estudio de los resultados se deben recolectar los datos obtenidos de manera clara y para los cuales se establecieron los siguientes formatos en la ficha de recolección de datos.

Cuadro N° 5 Recolección de datos para prueba de límite de coagulación de la dilución de trabajo.

N° de réplicas	soluciones				Resultados esperados			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1					-	+	+	-
2					-	+	+	-

A continuación se presenta el Protocolo de validación realizado:

Protocolo de Validación de la prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel-Clot para el producto Furosemida PL 20mg/2 mL Solución inyectable




LABORATORIOS
COPIA
AUTORIZADA
DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA

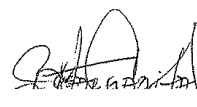
Protocolo N° PVE-1C-1/10

Referencia: Guía de validación de la prueba de sensibilidad de amebocitos de Limulus como la prueba de endotoxinas de productos terminados para uso parenteral en humanos y animales, productos químicos y dispositivos médicos; de la FDA.

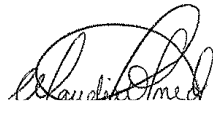
Redactado por:


Claudia Osorio
(Analista Microbiológico)

Revisado por:


(Jefa de Microbiología)

Aprobado por:


(Gerente/A. de C.)

Primer Laboratorio Salvadoreño Certificado por ISO 9001:2000



1. PROPOSITO Y ALCANCE:

El propósito de la validación de este método de análisis de control de calidad es demostrar que el método de ensayo para la detección de endotoxinas bacterianas es el adecuado para producir resultados de confiables y seguros durante la ejecución del mismo.

Además de garantizar que el producto inyectable Furosemida PL cumple con este requisito exigido por las normativas de fabricación para productos parenterales.

2. JUSTIFICACIÓN DEL MÉTODO:

La prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel Clot es el ensayo clásico y el más elemental entre los métodos del LAL, permite determinar la presencia y concentración de endotoxinas en formas farmacéuticas parenterales, productos biológicos, veterinarios, material médico, materias primas, agua para uso en inyectables, etc.

El ensayo se puede desarrollar de forma cuantitativa (ensayo de coagulación) o semi-cuantitativa (ensayo límite). Produce resultados binarios, positivo (+) o negativo (-). Un tubo es positivo cuando el tubo permanece intacto después de que se invierte cuidadosamente un ángulo de 180°, cualquier otra condición es interpretada como negativa.

Este método ofrece las siguientes ventajas: es rápido, específico y fácil de realizar, implica un equipamiento más sencillo y menos costoso además de la utilización de volúmenes mínimos de reactivos y muestras, obtención de resultados confiables y en corto tiempo (1 hora). Es menos susceptible a inhibición y presenta una alta sensibilidad para la detección de endotoxinas bacterianas.

3. RESPONSABILIDADES Y COMPETENCIAS:

El proceso de validación será competencia de la Gerencia de aseguramiento de la calidad y del equipo de validación.

El equipo de validación estará formado por el/ la coordinador(a) del área de microbiología y dos analistas encargados de la realización de las pruebas de manera cotidiana; así como de planificar y desarrollar el proceso de validación. Además serán responsables de redactar los documentos de la validación: protocolo de validación, informe y certificado de validación.

La Gerencia de aseguramiento de calidad y la coordinación del área de microbiología junto con los analistas serán los responsables de la revisión y aprobación de la documentación relacionada a la validación: protocolo, informe y certificado de validación.

Serán responsables de ejecutar los ensayos de validación el técnico de microbiología (Judith Zavaleta de microbiología) y la jefa de microbiología (Lic. Margarita Osorio) y la jefa de microbiología (Lic. Margarita Osorio).

4. CUALIFICACIÓN DE AREAS, EQUIPO Y ELEMENTOS REQUERIDOS

4.1 AREAS

Lugar de validación: Área de análisis de esterilidad del laboratorio de microbiología.

Instalación: La área debe contar con cedula de filtro HEPA con medio filtrante de microfibras de vidrio a prueba de agua de 99.97% – 99.99% (ver anexo N°1).

Temperatura y humedad regulada a 18-23°C y 30-60% respectivamente según Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006. RPEP-07-7.04-03/02

Debe contar con limpieza y sanitización de áreas y equipos según PEO-07-7.04-04.

Además antes de iniciar el ensayo se debe limpiar correctamente el flujo laminar con alcohol isopropílico 70%

4.2 EQUIPO

El instrumental y las características de este, requeridas para el desarrollo del método a validar serán los siguientes:

- Estufa de calor controlado: capacidad de calentamiento de hasta 250 ± 1 °C
- Máquina de baño de agua: capacidad de temperatura de 100 ± 0.2 °C.
- Termómetro: rango definido de medición de temperatura de 100' mín. con exactitud de $\pm 0.1^\circ$.
- Cámara de flujo laminar: con filtros HEPA 99.99%.
- Tiras indicadoras de pH con rango de 0-14. Marca MERCK, lote: HC948420

5. CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN, OPERACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO Y ELEMENTOS.

- ESTUFA DE CALOR CONTROLADO.

CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN	CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
	Marca	JINCON EXPORTS
	Modelo	EXPO – HITECH
	Serie	017-01
	Código interno	05.00.003
	Especificaciones	Rango de temperatura 250°C, división mínima 1°C
	Operación realizada	Despirogenización de material de vidrio

CUALIFICACIÓN DE OPERACION	Detalle de la operación	Para material de vidrio, utilizar ciclos de esterilización/despirogenización con calor seco a una temperatura de al menos 250°C por 30 minutos como mínimo. Utilizando según procedimiento de uso de estufa PEO-05-5.11-05/17
	Calificación de la operación	Requerimientos especificados por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 32), en el apartado general <85> Prueba de endotoxina bacteriana
CUALIFICACIÓN DE FUNCIONAMIENTO	Calibración	El equipo está sujeto a un plan de mantenimiento RC-08.03 y a un plan de calibración RC-08.04 que refleja la documentación del método de calibración: comparación directa del instrumento con el patrón de trabajo N° 63413 con trazabilidad a NIST. Según la norma OIML R 111 realizado por SERCAL. <small>(ver anexo 2)</small>

- MAQUINA DE BAÑO DE AGUA

	CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN	Marca	PRESICIÓN SCIENTIFIC
	Modelo	183
	Serie	25AT - 12
	Especificaciones	Capacidad de cámara 12L, rango de temperatura 0 - 100 °C, uniformidad de temperatura ± 0.2 a 37 °C, sensibilidad de temperatura ± 0.1 a 37 °C
	Operación realizada	Prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel Clot.

Primer Laboratorio Salvadoreño Certificado por ISO 9001:2000



CUALIFICACIÓN DE OPERACIÓN	Detalle de la operación	Incubación de tubos de prueba de endotoxina bacteriana por 60 ± 2 minutos a 37°
	Calificación de la operación	Pre calentamiento del baño y estabilización de la temperatura con 30 minutos de anticipación como mínimo a la realización de la prueba. Cambio de agua, cada 2 días. Registro de temperatura diaria RPEO-05-4.10-04/13.

- CAMARA DE FLUJO LÁMINAR

	CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN	Marca	VECO
	Modelo	GHFL AL
	Serie	24048.3
	Especificaciones	Cámbula de filtro HEPA 99.9 %, protección frontal hacia abajo. penetración $\leq 0.10\%$, poder de retención de partículas desde 0.3 micras en adelante.
	Operación realizada	Preparación de tubos para prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel Clot.
CUALIFICACIÓN DE OPERACIÓN	Detalle de la operación	Preparación de los tubos de la prueba con sus respectivos controles positivo y negativo. Manejo de material, reactivos y muestras a utilizar.
	Calificación de la operación	Monitoreo ambiental por plaqueo y muestreo de aire con equipo MAS 100 dentro y fuera de la cámara de flujo laminar según "procedimiento de monitoreo ambiental y superficies en áreas de análisis microbiológico" PEO-07-7.16-01. Realización 2 veces por semana.

CUALIFICACIÓN DE FUNCIONAMIENTO	Calibración	Filtro Astrocel ® type T-M, prueba de eficiencia por Scan test utilizando un caudal de aire de 336 CFM, que indica que es mejor y mas confiable que DOP para probar la misma. Operación de acuerdo a clace 100 del Federal Estándar 209-E de la E.U.A.
--	-------------	--

6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

6.1 Descripción del método de muestreo.

La toma de muestras es realizada por las personas que realiza los controles en el proceso de fabricación y lleno de inyectables tanto al inicio, durante y al final del mismo de manera aleatoria.

Se remiten 3 ampollas de muestra de inicio y 3 ampollas de muestra de final de producción de tres lotes diferentes al área de control de calidad microbiológica con su respectiva nota de remisión según el formato RPEO-09-9.19-00/03.

6.2 Parámetros analíticos a estudiar.

La validez de los resultados obtenidos de la determinación de endotoxinas, requiere de una demostración adecuada de que el reactivo LA, cumple con la sensibilidad que declara en su etiqueta y en su certificación de calidad; además de demostrar que el material de prueba al cual se le aplica este método, no inhibe ni aumenta la reacción, ni causa otro tipo de interferencia con la prueba, por lo que se realizará la *prueba de factores de interferencias* (cuyo proceso se describe posteriormente), la cual incluye la *verificación de la sensibilidad del reactivo LAL*, siendo estas

dos pruebas los parámetros requeridos para validar la prueba de endotoxina bacteriana por el método LAL.

Posterior a esta prueba se realizará la *prueba de límite de coagulación* para validar que la muestra ya sea directa o a una dilución de trabajo no contiene endotoxinas bacterianas y se le puede aplicar este método de análisis cotidianamente.

6.3 Descripción del método analítico.

La presencia de endotoxinas es determinada por el incremento de la densidad óptica detectada por la formación de un gel o coágulo en solución que se desarrolla al combinarse el lisado de amebocitos o *Limulus polyphemus* con las endotoxinas bacterianas.

Esta reacción ha sido empleada como la base de un ensayo cualitativo o semi-cuantitativo para endotoxina, siendo el reactivo la proteína obtenida de los amebocitos lisados de *Limulus*, ensayo conocido como Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL).

El objetivo final de este ensayo es la detección de la gelificación de la proteína después de ser incubada con endotoxina bajo condiciones específicas de tiempo y temperatura.

6.4 Reactivos y solventes

- Control Estándar de Endotoxina (CEE) *Escherichia coli* de 0.5 µg/vial; lote: 121 (equivalente a 500 ng/vial) reconstituido según certificado para obtener una concentración de 1,000 UE/mL. (Ver anexo

Nº 3)

- Agua grado despirogenizada para prueba de progenios, lote: 514-3665. (Ver anexo N° 4)
- Reactivo LAL con sensibilidad de 0.125 UE/mL; lote: 510-02-528. (Ver anexo N° 5)

Nota: verificar la combinación de de CEE y Reactivo LAL especificada en certificados de análisis del fabricante a fin de obtener una relación de potencia definida entre ambos, de lo contrario no se obtendrán resultados que sustenten el proceso de validación. (Ver anexo N°6)

Los elementos requeridos para el desarrollo del método son:

- Alcohol isopropílico 70%
- Gorro.
- Guantes.
- Jeringas estériles de 1, 5 y 10mL de capacidad.
- Mascarilla.
- Papel absorbente.
- Papel parafilm.
- Reloj.
- Traje estéril y zapateras
- Tijeras.
- Tubos de 10 x 75 mm Despirogenado

6.5 Procedimientos

Antes de iniciar con los procedimientos se debe realizar el cálculo de:

- ✓ Máxima Dilución Válida (MDV): es la dilución máxima permitida de una muestra a la que se le puede determinar el límite de endotoxina.

La ecuación general para determinar la MDV es:

$$MDV = \frac{(\text{limite de endotoxina} \times \text{concentración de la solución muestra})}{\lambda}$$

Donde:

λ = sensibilidad del reactivo LAL declarada en la etiqueta.

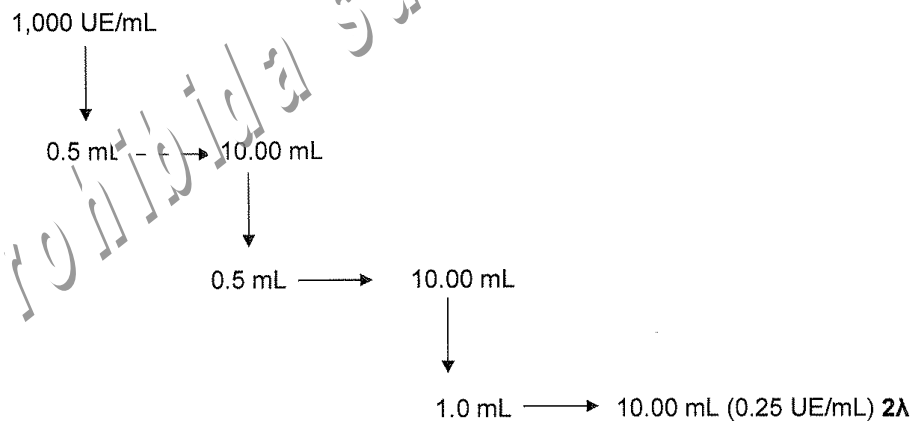
$$MDV = \frac{(3.6 \text{ UE/mg}) (20 \text{ mg})}{0.125 \text{ UE/ml}} = 576$$

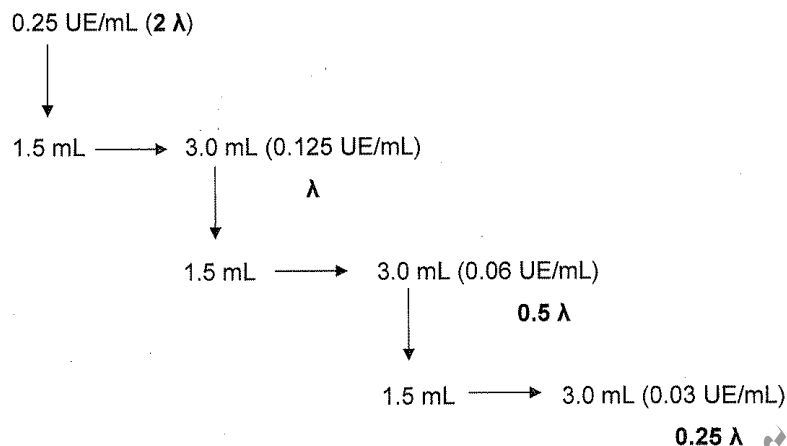
Es decir, se puede utilizar hasta una dilución de 1: 512 por multiplica

- ✓ Cascada de diluciones de Endotoxina Estándar (ver anexo N°7)

Cada vial rotula 2,500 UE/vial.

Reconstituido con 2.5 mL para obtener 1,000 UE/ml





6.5.1 Verificación de la sensibilidad de LAL

Se debe confirmar la sensibilidad del reactivo usando un vial del lote del reactivo LAL.

Empleando un solo lote del CEE, se prepararán series de diluciones de la endotoxina, utilizando un factor de dilución 1:2 para dar concentraciones de 2λ , λ , 0.5λ y 0.25λ según la cascada de diluciones antes desarrollada, donde λ es la sensibilidad declarada en la etiqueta.

Realizar la prueba a LAL por cuadruplicado para cada una de las cuatro concentraciones del CEE. Incluyendo un control negativo para la interpretación.

6.5.2 Dilución de trabajo

Antes de realizar las pruebas de validación se debe proceder a:

- Preparar un pool por cada lote de producto, uniendo 1 mL en un tubo apirógeno del contenido de las muestras de inicio y final de producción. Ensayar los tres lotes de manera individual en sesiones diferentes.

- Realizar una serie de diluciones de la muestra: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512 (ver anexo N° 8) y trabajar la muestra directa sin dilución, a fin de encontrar la dilución de trabajo óptima para los ensayos de rutina, esto permitirá reducir grandemente la repetición de muchas pruebas además de disminuir el gasto de muestra y de reactivos.

Trabajar las diluciones según el procedimiento de la prueba de interferencia. Utilizar la dilución (o muestra directa) que no presente formación de coágulo para la prueba de Límite de coagulación. Esta dilución debe ser mínimamente dos veces mayor que la primera dilución en la cual la interferencia no es evidente y no debe sobrepasar la máxima dilución válida.

6.5.3 Prueba de factores de interferencia. S. (Ver anexo N°9)

Preparar las siguientes series de trabajo:

A) Solución de muestra de la preparación en análisis.

Muestra directa y serie de diluciones preparadas sin adición de endotoxina. Realizar por cuadruplicado cada tubo.

B) Prueba de interferencia.

Muestra directa y serie de diluciones preparadas adicionando endotoxina cuyas concentraciones finales deben ser de 2λ, λ, 0,5 λ y 0,25 λ. Realizar por cuadruplicado cada tubo.

C) Control de sensibilidad declarada en la etiqueta del reactivo LAL o control positivo. CEE diluido en agua, cuyas concentraciones finales deben de ser 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$. Realizar por duplicado cada tubo.

D) Control negativo de agua reactivo para LAL.

Agua despirogenizada en igual volumen. Realizar por duplicado cada tubo.

- Procedimiento.

Mezclar volúmenes iguales de cada una de las soluciones preparadas (0,1 ml) con el reactivo de LAL en los tubos, taparlos con papel parafilm e incubarlos en baño de agua a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 60 ± 2 min. Una vez iniciada la incubación evitar vibraciones y mantener en reposo a lo largo de todos los tubos de prueba.

6.5.4 Interpretación de resultados.

Al finalizar el período de incubación, invertir cuidadosamente cada tubo e invertirlo lentamente hasta 180°C . Un resultado positivo (+) se caracteriza por la formación de un gel firme que mantiene su integridad cuando se invierte el tubo. Un resultado negativo (-), se caracteriza por la ausencia de un gel firme o por la formación de una masa viscosa que no mantiene su integridad cuando se invierte el tubo.

6.5.5 Prueba de límite de coagulación de la muestra

Preparar las siguientes soluciones por duplicado

A. Solución de ensayo

Solución de trabajo o muestra directa según el resultado de la prueba de interferencias.

B. Control positivo del material de prueba o interferencias.

Solución de trabajo o muestra directa según el resultado de la prueba de interferencias mas endotoxina, a una concentración de 2λ .

C. Control positivo

Agua desmineralizada.

D. Control negativo de agua reactivo para LAL.

Agua despirogenizada.

6.6 Cálculos.

Media Geométrica

Calcular la sensibilidad del reactivo LAL, determinando el valor medio de los logaritmos de la concentración en el punto final y luego el antilogaritmo del valor medio.

La media geométrica de la concentración del punto final es la sensibilidad medida del reactivo LAL (en EU/ml).

Se llama punto final al último punto en el cual se lee un positivo.

- A este punto final se le calcula el logaritmo.

- Una vez se tengan los respectivos logaritmos se halla la sumatoria (Σ) y luego el promedio (X).

- Con el valor del promedio (X) se calcula el promedio geométrico (GM) de la siguiente forma:

$$GM = \text{antilog. } X$$

7. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

7.1 Prueba de interferencias

Esta prueba no es válida a menos que las soluciones A y D no muestren ninguna reacción y el resultado de la solución C confirme la sensibilidad declarada en la etiqueta. Si la sensibilidad del lisado determinada en presencia de la solución de muestra en análisis de la solución B está en el rango de 0.5λ y 2λ para confirmar la sensibilidad declarada en la etiqueta, la solución de muestra no contiene factores que interfieran en las condiciones experimentales utilizadas. En caso contrario, la solución de muestra que se va a analizar interfiere con la prueba y se puede realizar nuevamente la prueba leyendo una dilución mayor que no exceda la MDV.

7.2 Prueba de límite de coagulación de la muestra

La prueba no es válida a menos que ambas determinaciones repetidas de las soluciones B y C sean positivas y la solución D sea negativa. La preparación en análisis cumple con la prueba si se obtiene un resultado negativo en ambos tubos que contienen la solución A.

La prueba se debe repetir cuando se obtenga un resultado positivo en un tubo que contenga la solución B y un resultado negativo en el otro.

La preparación en análisis cumple con la prueba si se obtiene un resultado negativo en ambos tubos que contienen la solución A en el resultado de la repetición. Si la prueba es positiva para la preparación en análisis a una dilución menor que la MDV, se puede repetir la prueba a una dilución que no sea mayor que la MDV.

8. ESTUDIO DE LOS RESULTADOS.

Para el estudio de los resultados se deben recolectar los datos obtenidos de manera clara según los siguientes formatos en la ficha de recolección de datos

(ver anexo N°10):

- Confirmación de sensibilidad.

N° de réplicas	2 λ	λ	0.5 λ	0.25 λ
1				
2				
3				
4				

- Prueba de interferencias

Serie A		Serie B				Serie C				Prueba de límite
Mx o dilucion	Mx	2 λ	λ	0.5 λ	0.25 λ	2 λ	λ	0.5 λ	0.25 λ	
Mx	Mx									
1/2	1/2									
1/4	1/4									
1/8	1/8									
1/16	1/16									
1/32	1/32									
1/64	1/64									
1/128	1/128									
1/256	1/256									
1/512	1/512									


Prueba de límite de coagulación de la muestra o dilución de muestra.




N° de réplicas	soluciones				Resultados esperados			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1					-	+	+	-
2					-	+	+	-

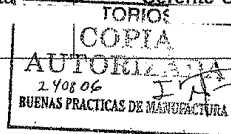


Anexo N°1

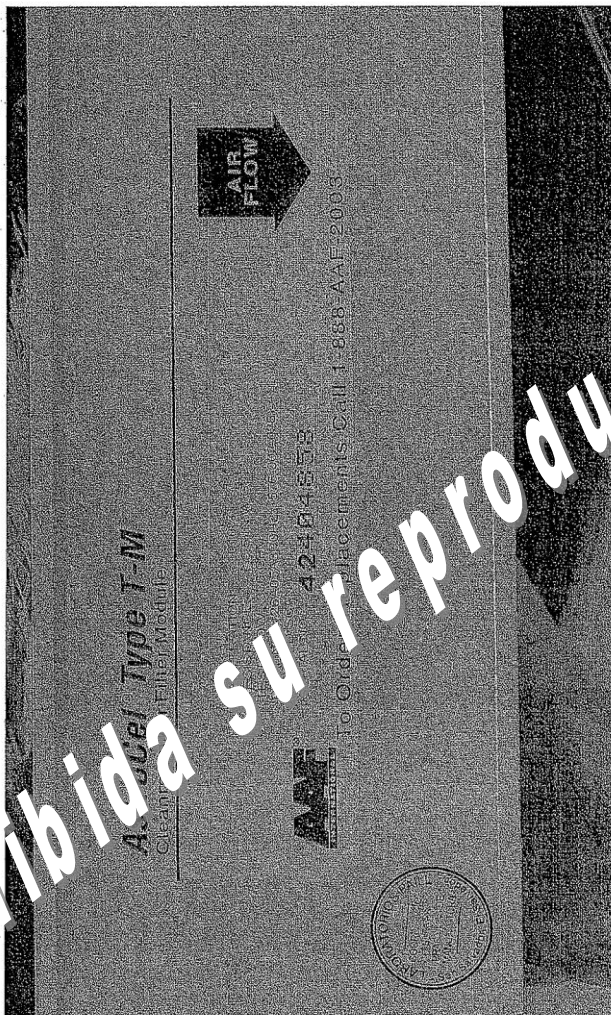
Certificado de Cedula de filtro HEPA CF-02

 LABOR		CÉDULA DE FILTRO HEPA		CÓDIGO: CF-02	
ÁREA DE UBICACIÓN		Departamento de Microbiología sección Esterilidad			
CÓDIGO DE ÁREA		BM-05			
PROVEEDOR LOCAL		Control Aire			
PROVEEDOR EXTRANJERO		AAF			
No. de SERIE del FILTRO		42404858			
FECHA INSTALACIÓN	30 Noviembre/2005	FECHA DE ARRANQUE	30 Noviembre/2005		
ACCESORIOS CON LOS QUE CUENTA LA UNIDAD		ninguno			
ESPECIFICACIONES DEL FABRICANTE (SEGÚN CÓDIGO DEL ESTILO)					
No. PARTE DEL FILTRO		26A05A3P0H2			
1. MEDIDA DE LA CARATULA (pulgadas)		26: 23 5/8 X.23 5/8			
2. MEDIO FILTRANTE (microfibras de vidrio a prueba de agua)		A: AstroCel HEPA-99.97% o 99.99%			
3. MEDIDA DE CELDA		05: 5/8" Sellador TM-2 cabina, 5" profundidad Máxima del paquete O "X" profundidad del paquete			
4. PROFUNDIDAD DEL PAQUETE DEL MEDIO FILTRANTE(separadores de la cinta)		A: 2" paquete del Medio filtrante			
5. TAMAÑO DEL COLLAR , COMPUERTA Y UNION.		3: 10"Collar, Cierre ajustable, unión de poliuretano			
6. MATERIAL DE SELLO		P: No tiene			
7. LOCALIZACIÓN DEL SELLO		0: No tiene			
8. NIVEL DE ACEPTACIÓN		H: Medio HEPA-99.99% probado por scan. cabina (A) de la sección 2.			
9. PROTECCIÓN FRONTAL		2: Protección Frontal hacia abajo			

 ELABORADO POR COORDINACION BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA Lic. Claudio Martínez Coordinador de BPM	REVISADO POR  Lic. Miguel Escobar Gerente de Planta	APROBADO POR  Ing. Héctor Escobar Gerente General
--	--	---



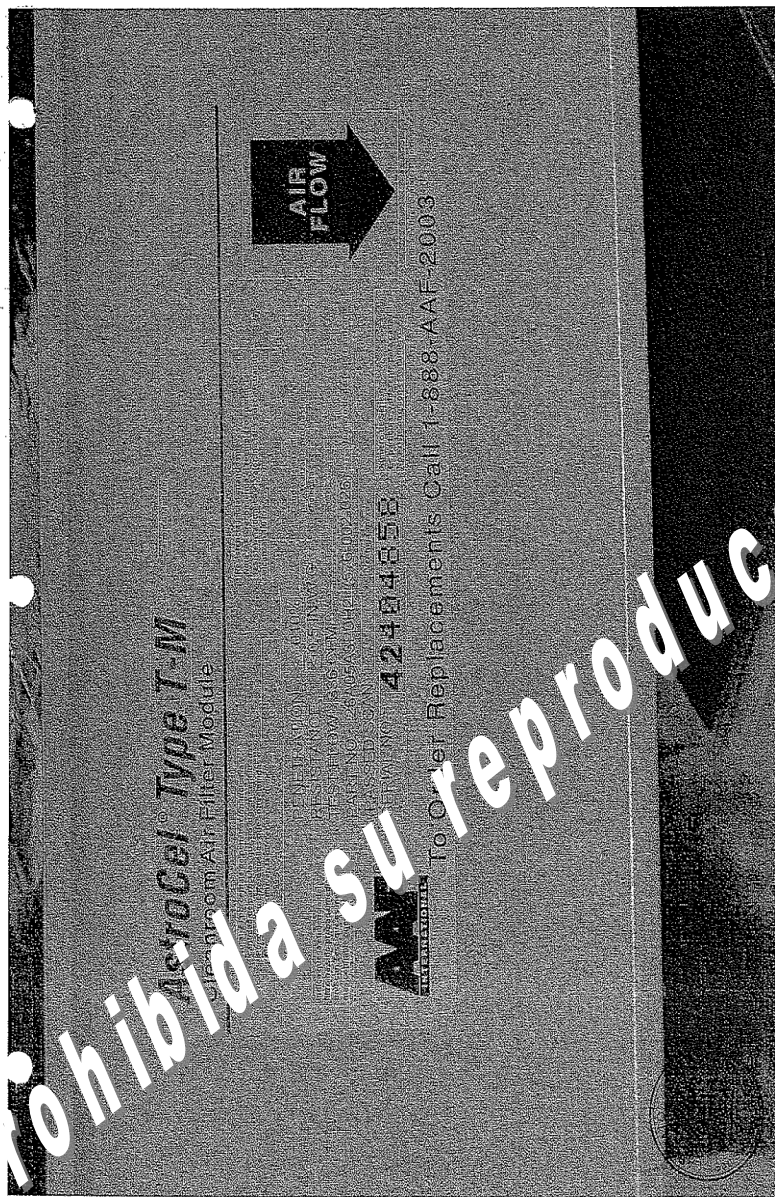
	CÉDULA DE FILTRO HEPA DEPARTAMENTO MICROBIOLOGÍA SECCION ESTERILIDAD	CÓDIGO: CF-02
--	---	----------------------



Página 1 de 1

Prohibida su reproducción





Prohibida su reproducción

Primer Laboratorio Salvadoreño Certificado por ISO 9001:2000

Es Calidad, Es Tecnología, Es Paill...



Cóserio

Anexo N° 2

Certificado de calibración de Estufa de calor controlado JINCON EXPORTS

**SERVICIOS DE CALIBRACIÓN, S.A. DE C.V.****CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN**

Certificado No. TEM03100203SC
 Fecha de calibración: 2010-02-03

Equipo : ESTUFA/CONTROLADOR DE TEMPERATURA
Marca : JINCON EXPORTS/SM
Modelo : LABORATORY OVEN/ETH-03
Serie : 17/01/SN
Código interno : 05-0-003
Ubicación : PREPARACIÓN DE MEDIOS E INCLUBACIÓN
Rango : 250 °C
División mínima : 1 °C
Lugar de calibración : PREPARACIÓN DE MEDIOS E INCLUBACIÓN
Dirección : 8ª AVENIDA SUR Y 10 CALLE ORIENTE, # 470, SAN SALVADOR, EL SALVADOR
Fecha de recepción : 2010-02-03
Cliente : LABORATORIO DE CALIBRACIÓN
Dirección : 8ª AVENIDA SUR Y 10 CALLE ORIENTE, # 470, SAN SALVADOR, EL SALVADOR
Método de calibración : COMPARACIÓN DIRECTA DEL INSTRUMENTO CON EL PATRÓN.
Medio de referencia : PRO-METRO-TEM-001-00
Número de referencia : OIML R 133

TRAZABILIDAD: SERCAL asegura la trazabilidad del patrón de trabajo No. PSTEM02091229SC utilizados en esta calibración, por el certificado del patrón de referencia No. 63413 con trazabilidad a NIST

Pág. 1/1

Oficina: Residencial Andalucía, No.52, Mejicanos, Laboratorio: 5ª. Av., CC Guadalupe, Local 1-1, Centro de Gobierno San Salvador, El Salvador, C.A. Telefax: (503) 2272-1735, Celular (503) 7888-9128, e-mail: sercal_es@yahoo.com

Primer Laboratorio Salvadoreño Certificado por ISO 9001:2000




SERVICIOS DE CALIBRACIÓN, S.A. DE C.V.

Certificado No. TEM03100203SC

RESULTADOS OBTENIDOS:

VALOR PATRON	VALOR MINIMO (°C)	VALOR MAXIMO (°C)	VALOR PROMEDIO (°C)	CORRECCION (°C)	INCERTIDUMBRE (°C)
240	247	247	247	-7	1
250	258	258	258	-8	1
260	269	269	269	-9	1

La temperatura indicada se da por la relación siguiente:
 Temperatura = indicación programado + valor corrección

La incertidumbre se calculó con un factor de cobertura de $k = 2$ para un intervalo de confianza de aproximadamente 95 %, según nota técnica No. 1297 del NIST

Condiciones ambientales del lugar de calibración: -23 °C, 45 % HR

Este certificado expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas.

Podrá ser reproducido de forma completa, previa autorización.

Los resultados obtenidos en este documento se refieren al momento que se realizaron las mediciones.

Es responsabilidad de la empresa solicitante el uso adecuado de los instrumentos calibrados.


 ING. HERBERT ESCOBAR
 TÉCNICO



Pág. 2/2

Oficina: Residencial Andalucía, No.52, Mejicanos, Laboratorio: 5ª. Av., CC Guadalupe, Local 1-1, Centro de Gobierno San Salvador, El Salvador, C.A. Telefax: (503) 2272-1735, Celular (503) 7888- 9128, e-mail: sercal_es@yahoo.com

Primer Laboratorio Salvadoreño Certificado por ISO 9001:2000



Anexo N° 3

Certificado de compilación de Control Estándar de Endotoxina



Control Standard Endotoxin (CSE)
Certificate of Compliance

The lot of CSE listed below was manufactured in accordance with written procedure.

CSE lot #: 121
Source: *Escherichia coli* O113:H10
Concentration: 0.5 µg/vial
Fillers: None
Catalog #: E0005
Expiration Date: 29 JAN 2005

This lot of CSE meets the specifications of Associates of Cape Cod, Inc.

PROHIBIDA SU REPRODUCCION

3/4/10
Quality Review

Elin McLaughlin 314110
Quality Review

QC011

Revision 001, JUN2002

4 Bernard F. Saint Jean Drive ■ East Falmouth, Massachusetts 02536 ■ Tel: (800)848-3268 ■ (508)540-3444 ■ Fax: (508)540-8680

Primer Laboratorio Salvadoreño Certificado por ISO 9001:2000



Anexo N° 4

Certificado de compilación de Agua grado reactivo LAL



**LAL Reagent Water (LRW)
Certificate of Compliance**

LRW Lot #: 314-3665
Catalog #: W0504 / W050P
Date of Expiration: 15 JAN 2011

This lot of LRW has less than 0.001 EU/mL endotoxin and less than 1.56 µg/mL of (1,3)-β-D-glucan. It meets the specifications of Associates of Cape Cod, Inc. for use as an LAL Reagent Water.

[Signature]
Quality Review

[Signature] 2/10/09
Quality Review



QC014

Rev. 008, Oct 2008
CCF 7735

24 Bernard E. Saint Jean Drive ■ East Falmouth, Massachusetts 02536 ■ Tel: (800)848-3248 ■ (508)540-3444 ■ Fax: (508)540-8680

Primer Laboratorio Salvadoreño Certificado por ISO 9001:2000



Anexo N° 5

Certificado de compilación de Lisado de amebocitos de Limulus Pyrotell®



Pyrotell® Limulus Amebocyte Lysate (LAL)
Certificate of Compliance

The lot of Pyrotell listed below meets the written requirements for sterility, moisture, pH, and endotoxin sensitivity.

Pyrotell lot #: 510-02-528
 Catalog #: G5125
 Sensitivity: 0.125 EU/mL
 Expiration Date: 22 FEB 2015

This lot of Pyrotell has been released for sale by the Center for Biologics Evaluation and Research, U.S. F.D.A.

Andrew Perry 3/26/10
 Quality Review

Andrew Perry 3/26/10
 Quality Review

Rev. 004

124 Bernard E. Saint Jean Drive ■ East Falmouth, Massachusetts 02536 ■ Tel: (800)848-3248 ■ (508)540-3444 ■ Fax: (508)540-8680

Primer Laboratorio Salvadoreño Certificado por ISO 9001:2000



Anexo N° 6

Certificado de estandarización de Control Estándar de Endotoxina frente al Estándar de Referencia de Endotoxina Pyrotel®.



CERTIFICATE OF ANALYSIS
Standardization of CSE against RSE
Pyrotel® Gel-Clot Method

ACC Internal Control Number: QC-0510-131
Test date: 05/24/2010

Reagent	Sensitivity (EU/mL)	Catalog No.	Lot No.	Exp. Date
Pyrotel®	0.125	G5125	510-02-528	22 FEB 2015
Control Standard Endotoxin (CSE), 0.5 µg/vial (= 500 ng/vial)		E0005	121	29 JAN 2015
Reference Standard Endotoxin (RSE)		N/A	EC-6-3	N/A
Potency of CSE (per ng)	5 EU/ng or 5 IU/ng			
Potency of CSE (per vial)	5 EU/ng x 500 ng/vial = 2,500 EU/vial or 2,500 IU/vial			

If the CSE is reconstituted with 5 mL, the endotoxin concentration will be 500 IU/mL.

To obtain a CSE concentration of 1,000 EU/mL, reconstitute the vial with 2.5 mL of LAL Reagent Water.

Quality Assurance

Date

Quality Assurance

Date

Notes:

1. The stated potency applies only to the combination of CSE and LAL lots specified on this certificate.
2. The relative value of the EU and IU is stated in the USP Bacterial Endotoxins Test chapter, <85>, and in the USP Bacterial Endotoxins chapter, 2.6.14.
3. Potency is subject to change within the error of the test at any time.

Form QC004-Pyrotel-0.5, Revision 3, August 2009

124 Bernard E. Saint Jean Drive ■ East Falmouth, Massachusetts 02536 ■ Tel: (800)848-3248 ■ (508)540-3444 ■ Fax: (508)540-8680

Primer Laboratorio Salvadoreño Certificado por ISO 9001:2000



Anexo N° 7

Preparación de diluciones CEE

- Tomar 4.5 mL de agua despirogenizada en una jeringa de 5 mL, colocar 1.5 mL en cada uno de 3 tubos despirogenados rotulados como λ , 0.5 λ y 0.25 λ respectivamente.
- λ : Con una jeringa de 3 mL tomar 1.5 mL de la dilución de endotoxina 2 λ y colocarlo en el tubo rotulado como λ . Tapar y homogenizar.
- 0.5 λ : Con una jeringa de 3 mL tomar 1.5 mL de la dilución de endotoxina λ recién preparada y colocarlo en el tubo rotulado como 0.5 λ . Tapar y homogenizar.
- 0.25 λ : Con una jeringa de 3 mL tomar 1.5 mL de la dilución de endotoxina 0.5 λ recién preparada y colocarlo en el tubo rotulado como 0.25 λ . Tapar y homogenizar.

Anexo N°8

Preparación de diluciones de muestra

Hacer un pool con las ampollas de muestra de inicio y de final de producción a fin de obtener una muestra homogénea y representativa del lote producido en un beacker de 10 mL despirogenado.

Tomar 3 mL de agua libre de pirógenos con una jeringa de 5 mL y rotularla como "1/2". Tomar 3.5 mL de agua libre de pirógenos con una jeringa de 5 mL y colocar 2 mL en un tubo despirogenado rotulado como "1/4" y colocar el 1.5 mL restante en un tubo despirogenados rotulado como "1/8".

- Dilución 1/2:
Del pool tomar 1.5 mL con la jeringa previamente rotulada como "1/2". Tapar y homogenizar.
- Dilución 1/4:
Del tubo rotulado como "1/2" tomar 2 mL con una jeringa de 5 mL y colocarlos en el tubo rotulado como "1/4". Tapar y homogenizar.
- Dilución 1/8:
Del tubo rotulado como "1/4" tomar 1.5 mL con una jeringa de 3 mL y colocarlos en el tubo rotulado como "1/8". Tapar y homogenizar.

De la misma manera, proseguir con la realización de las demás diluciones.

Anexo N° 9

Cuadro esquemático de prueba de interferencias

Solución	Muestra / Dilución	[] Endotoxina				Volumen de reactivo LAL	N° replicas
		2λ	λ	0.5 λ	0.25 λ		
A	0.1 ml de muestra y diluciones	-----				0.1 mL	4 c/u
B	0.05 ml de muestra y/o cada una de las diluciones	2λ	λ	0.5 λ	0.25 λ	0.1 mL	4c/u probando cada dilución con una muestra con extracto de bacterias
		0.05 ml de Estándares					
C	-----	2λ (0.1 ml)		0.1 mL		2	
		λ (0.1 ml)		0.1 mL		2	
		0.5λ (0.1 ml)		0.1 mL		2	
		0.25λ (0.1 ml)		0.1 mL		2	
D	Agua despirogenizada (0.1 ml)					0.1 mL	2

Anexo N° 10

Ficha de recolección de datos

Fecha de ensayo:

Producto:

Lote:

Ensayo N°:

Analista:

- Confirmación de sensibilidad

N° de réplicas	2 λ	λ	0.5 λ	0.25 λ	Punto Final	Log 10 Punto Fir
1						
2						
3						
4						
				Sumatoria (Σ)		
				Promedio		

GM= antilog. X

- pH

Mx = Dilución 1/16 = Dilución 1/256 =

Dilución 1/32 = Dilución 1/32 = Dilución 1/512 =

Dilución 1/4 = Dilución 1/64 =

Dilución 1/8 = Dilución 1/128 =

 Primer Laboratorio Salvadoreño Certificado por ISO 9001:2000



• Prueba de interferencias

Serie A		Serie B				Serie C				Serie D
Mx o dilucion		2 λ	λ	0,5 λ	0,25 λ	2 λ	λ	0,5 λ	0,25 λ	
Mx		Mx								
½		1/2								
¼		1/4								
1/8		1/8								
1/16		1/16								
1/32		1/32								
1/64		1/64								
1/128		1/128								
1/256		1/256								
1/512		1/512								

• Prueba de límite de coagulación

Nº de réplicas	soluciones				Resultados esperados			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1					-	+	+	-
					-	+	+	-



5.2 Realización de los ensayos sensibilidad, inhibición / realce y prueba límite bajo la metodología oficial de la USP 32 y los lineamientos de validación del método dados por la FDA en las instalaciones de un laboratorio nacional certificado.

El proceso fue iniciado en el mes de junio de 2010 más sin embargo como el proceso era nuevo en laboratorio la solicitud de reactivos se fue realizando en etapas ya que se debían realizar ensayos previos con cada analista a fin de estandarizar la técnica que se iba a utilizar. En este proceso el proveedor de reactivos informo un déficit de los mismos y ofreció solventar con un pedido que tomaría 4 meses. Mientras tanto se realizó una homologación de la técnica entre los analistas implicados a fin de disminuir el margen de error al llevar a cabo las mediciones de volúmenes pequeños, se transmitió información de la metodología a seguir y se ensayaron mediciones de volumen, aforos, rotulación de material, preparación de diluciones, reconstitución de reactivos y seguimiento del método completo de cada analista. Dado que no se obtienen resultados numéricos al realizar el ensayo no se puede demostrar la variación de cada analista a través de un coeficiente de variación.

Una vez solventado el déficit de reactivos, en el mes de septiembre se inicio nuevamente con la realización de los ensayos, pero no se obtenía resultado favorable en la confirmación de sensibilidad de los reactivos, lo cual produjo la repetición de dicha confirmación durante 4 semanas.

Se procedió a revisar la metodología y a buscar en la bibliografía respectiva la solución a este problema, al no encontrarse se solicito al proveedor de reactivos fuese intermediario para poder contactar a la Associates of Cape code Incorporated, empresa fabricante del reactivo y el estándar de endotoxinas. Tras esto fue solucionado el problema, ya que se debía conocer la relación entre los lotes de reactivo LAL y CEE que se fueran a utilizar para un mismo

ensayo, ya que su utilización no puede ser al azar entre los lotes sino que se debe comprobar la relación mediante los certificados de compilancia que la empresa provee y que deben ser distribuidos por los proveedores de cada país o bien pueden ser consultados en su página oficial de internet.

Por tales motivos el proceso se concluyo en noviembre, cumpliendo la realización de los ensayos planteados en el objetivo, pero no cumpliendo con el período de tiempo destinado.

A continuación se presenta el proceso de realización de las pruebas:

5.2.1 Preparación de reactivos:

Todas las operaciones de la prueba se llevaron a cabo en condiciones asépticas en un área de análisis del departamento de microbiología con filtración de aire (filtro HEPA 99.9%) y bajo flujo laminar, utilizando un desinfectante adecuado para limpiar las superficies de la misma.

Se reconstituyeron los reactivos solo al momento de ser utilizados.

- i) Endotoxina de referencia (EER)/Control estándar de endotoxina (CEE):
En este caso se utilizó un control estándar de endotoxina (CEE) *Escherichia coli* de 0.5 µg/vial equivalente a 500 ng/vial (2,500 UE/vial) lote: 121. Se reconstituyo con el volumen de agua reactivo LAL indicado en el membrete: 2.5 mL a fin de obtener una concentración de 1000 UE/mL, se agito durante 1 minuto dejando reposar 9 minutos en un periodo de 30 a 60 minutos. Ver anexo N° 6
Se utilizó esta solución concentrada para preparar las diluciones adecuadas de endotoxina 2λ, λ, 0.5 λ y 0.25 λ.
Cada dilución se agito por lo menos durante 30 segundos antes de continuar con la siguiente dilución.

ii) Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL).

Se utilizó el lote: 510-02-528, se reconstituyó con 5 mL de agua reactivo LAL indicado en el membrete. Se mezcló suavemente hasta disolución completa. Ver anexo N° 8

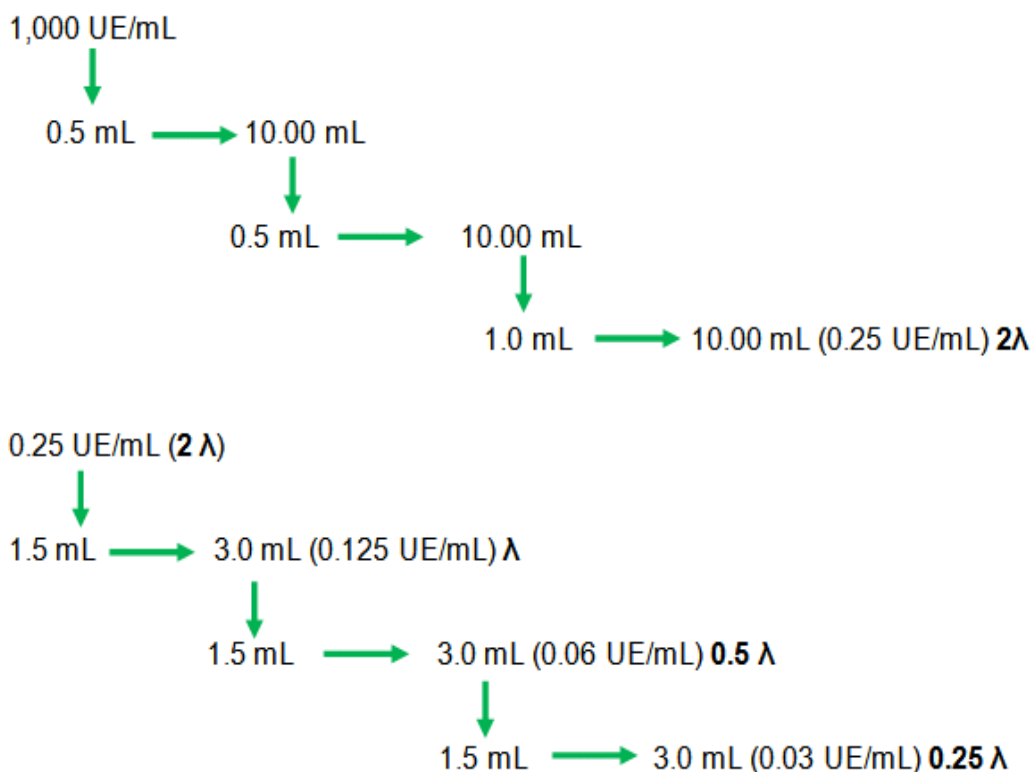
Se debe verificar la combinación de de CSE y Reactivo LAL especificada en los certificados de análisis del fabricante a fin de obtener una relación de potencia definida entre ambos, de lo contrario no se obtendrán resultados que sustenten el proceso de validación como por ejemplo no poder confirmar la sensibilidad del reactivo por no obtener ningún resultado positivo en ninguna concentración de endotoxinas. Esto es a causa de la relación intrínseca que existe al momento de la fabricación entre cada lote de estándar y reactivo, ya que son hechos con combinaciones específicas que no pueden sustituirse y de no utilizarse una combinación adecuada de ambos los resultados no serán fructíferos. Ver anexo N° 9

La primera prueba que se realizó fue la verificación de la sensibilidad del reactivo a emplear

5.2.2 Verificación de la sensibilidad del LAL

Cada analista empleando un solo lote del CEE, preparo diluciones de la endotoxina, utilizando un factor de dilución 1:2 para dar concentraciones de 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$ según la cascada de diluciones siguiente; donde λ es la sensibilidad declarada en la etiqueta.

Cada vial de CEE rotula 2,500 UE/vial, equivalente a 1,000 UE/mL al reconstituirlo con 2.5 mL.



Cada analista preparo series de 4 tubos por cada concentración de CEE preparada y se incluyó una serie de 2 tubos de control negativo con LWR. Según la figura N° 16:

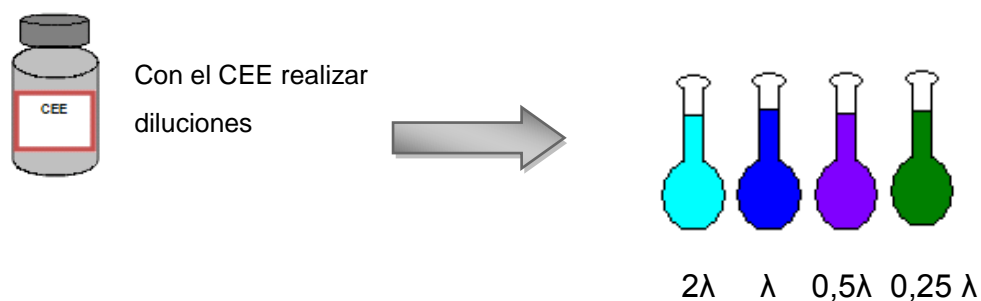
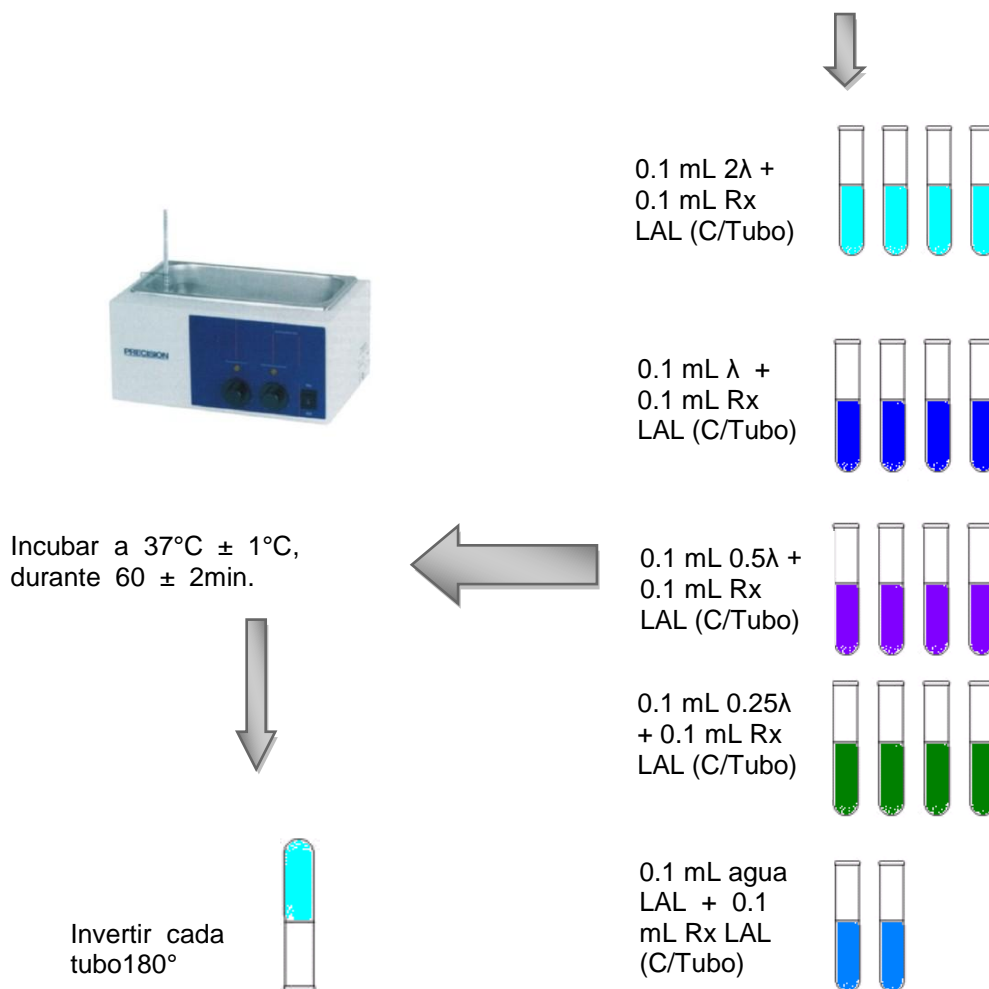


Figura N° 16 Esquema de verificación de sensibilidad de reactivo LAL



Continuación Figura N° 16

5.2.3 La siguiente prueba a desarrollar fue la prueba de factores de interferencias con la que se comprobaría si la muestra a analizar posee algún factor que inhiba o aumente la formación del coagulo en presencia de una concentración definida de endotoxina.



Figura N° 17 Ampollas de Furosemida PL

Primero se calculo la Máxima Dilución Valida (MDV) que indica la mayor dilución a la que se puede llevar la muestra y aun se puede detectar las endotoxinas bacterianas si estuvieran presentes.

- Determinación de la máxima dilución valida (MDV)

Se calculó la MDV del producto según la siguiente ecuación general:

$$MDV = \frac{\text{(Límite de endotoxina X concentración de la solución de muestra)}}{\lambda}$$

Donde:

λ = sensibilidad del reactivo LAL declarada en la etiqueta.

Dado que:

- El límite de endotoxina para el producto es no más de 3.6 UE/mg

- La concentración de la solución es 20 mg/mL.
- La sensibilidad a utilizar será 0.125 UE/ml.

$$\text{MDV} = \frac{(3.6 \text{ UE/mg} \times 20 \text{ mg/mL})}{0.125 \text{ UE/mL}}$$

$$\text{MDV} = 576$$

La MDV que se puede utilizar será de 1:512 usando un factor de dilución 1:2 para facilitar la realización de las mismas

5.2.4 Preparación de las soluciones de muestra

Los lotes empleados para el proceso de validación son:

E011G10, E069E10 y E26J10

Se utilizaron tres muestras de inicio y final de producción de tres lotes diferentes del mismo producto, cada analista realizó un pool en un tubo apirógeno con una muestra de inicio y final para cada serie de análisis.

El pH debe encontrarse en el intervalo de 6,0-8,0, o bien al pH especificado en la monografía individual correspondiente, este se verifico con tiras de papel indicador con rango de pH de 0 a 14 encontrándose los resultados dentro del rango establecido pero con leve variación de una a dos unidades entre algunas diluciones efectuadas.

Cada analista procedió a preparar las diluciones de muestra a probar según el anterior calculo de MDV 1:2, 1:4, 1: 8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512. A continuación se describe las preparaciones de algunas diluciones de muestra a probar

- Dilución 1/2:

Tomar 3 mL de agua libre de pirógenos con una jeringa de 5 mL y rotularla como "1/2", del pool tomar 1.5 mL con la jeringa previamente rotulada como "1/2". Tapar y homogenizar.

- Dilución 1/4:

Colocar 2 mL de agua libre de pirógenos en un tubo despirogenado rotulado como "1/4". De la jeringa rotulada como "1/2" tomar 2 mL con una jeringa de 3 mL y colocarlos en el tubo rotulado como "1/4". Tapar y homogenizar.

- Dilución 1/8:

Colocar el 2 mL de agua libre de pirógenos en un tubo despirogenado y rotulado como "1/8".

Del tubo rotulado como "1/4" tomar 2 mL con una jeringa de 3 mL y colocarlos en el tubo rotulado como "1/8". Tapar y homogenizar.

- Dilución 1/16:

Colocar el 2 mL de agua libre de pirógenos en un tubo despirogenado y rotulado como "1/16".

Del tubo rotulado como "1/8" tomar 2 mL con una jeringa de 3 mL y colocarlos en el tubo rotulado como "1/16". Tapar y homogenizar.

- Dilución 1/32:

Colocar el 2 mL de agua libre de pirógenos en un tubo despirogenado y rotulado como "1/32".

Del tubo rotulado como "1/16" tomar 2 mL con una jeringa de 3 mL y colocarlos en el tubo rotulado como "1/32". Tapar y homogenizar.

- Dilución 1/64:

Colocar el 2 mL de agua libre de pirógenos en un tubo despirogenado y rotulado como "1/64".

Del tubo rotulado como "1/32" tomar 2 mL con una jeringa de 3 mL y colocarlos en el tubo rotulado como "1/64". Tapar y homogenizar.

- Dilución 1/128:

Colocar el 2 mL de agua libre de pirógenos en un tubo despirogenado y rotulado como "1/128".

Del tubo rotulado como "1/64" tomar 2 mL con una jeringa de 3 mL y colocarlos en el tubo rotulado como "1/128". Tapar y homogenizar.

- Dilución 1/256:

Colocar el 2 mL de agua libre de pirógenos en un tubo despirogenado y rotulado como "1/256".

Del tubo rotulado como "1/128" tomar 2 mL con una jeringa de 3 mL y colocarlos en el tubo rotulado como "1/256". Tapar y homogenizar.

- Dilución 1/512:

Colocar el 2 mL de agua libre de pirógenos en un tubo despirogenado y rotulado como "1/512".

Del tubo rotulado como "1/256" tomar 2 mL con una jeringa de 3 mL y colocarlos en el tubo rotulado como "1/512". Tapar y homogenizar.

De manera paralela se procedió a verificar el pH de cada dilución realizada y de cada una de las muestras sin diluir, el cual debía encontrarse en un rango de 6 a 8.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la tabla N° 3:

Tabla N° 3 Resultados de medición de pH de lotes ensayados de Furosemida.

Dilución	L: E069E10			L: E011G10			L:E026J10		
Muestra	8	8	8	9	9	9	8	8	8
Dil. ½	7	7	7	8	8	8	7	8	7
Dil. ¼	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Dil. 1/8	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Dil. 1/16	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Dil. 1/32	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Dil. 1/64	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dil. 1/128	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dil. 1/256	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dil. 1/512	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Posterior a esto se prepararon las siguientes series de diluciones correspondientes a la prueba de interferencias en sesiones individuales por cada analista y para cada lote a ensayar:

A) Solución de muestra de la preparación en análisis.

Muestra y diluciones 1:2, 1:4, 1: 8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512 (0.1 mL de c/u). Realizado por cuadruplicado para cada una.

B) Prueba de inhibición / realce.

Muestra y diluciones 1:2, 1:4, 1: 8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512 (0.05 ml de c/u) adicionado de endotoxina cuyas concentraciones finales de 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$, (0.05 mL de c/u); se prueba cada concentración de endotoxina para la muestra y cada una de las diluciones a ensayar. Realizado por cuadruplicado para cada una.

C) Control de sensibilidad declarada en la etiqueta del reactivo LAL.
CEE diluido en agua, cuyas concentraciones finales deben de ser 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$. (0.1 mL de c/u) Realizar por duplicado.

D) Control negativo de agua reactivo para LAL.
Agua reactivo para LAL (0.1 mL). Realizar por duplicado.

Tal como se presenta a continuación en la figura N° 18:

Serie A



Serie B

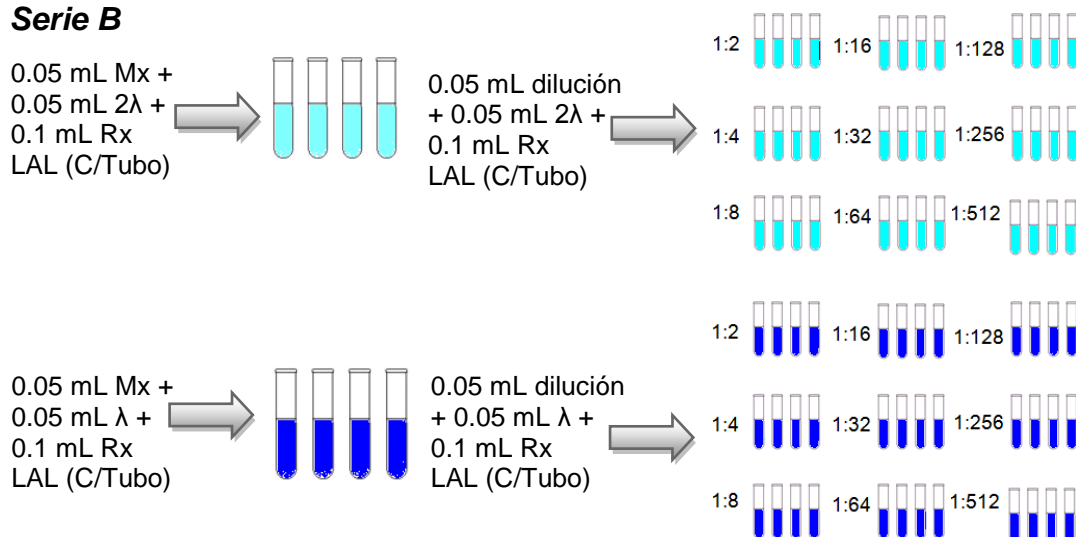
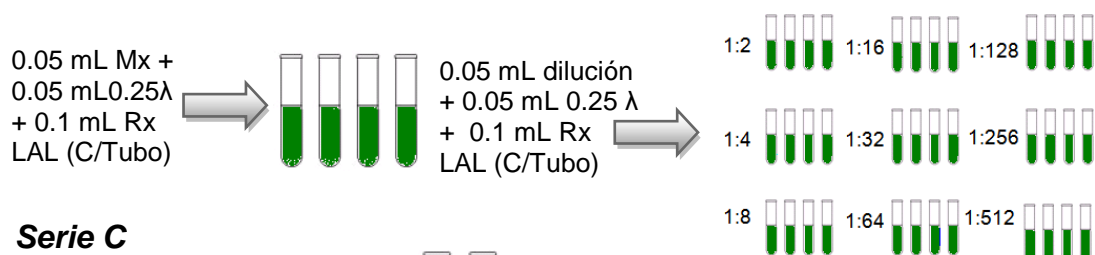
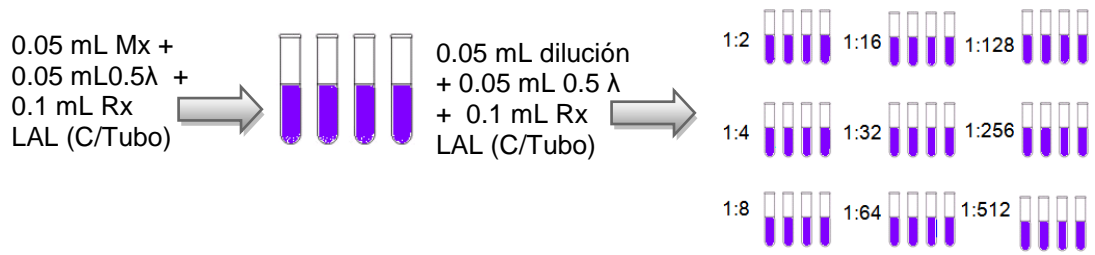
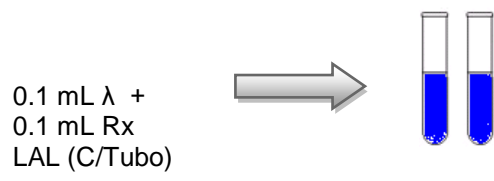
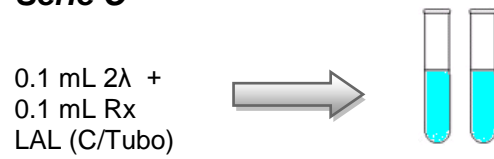


Figura N° 18 Esquema de prueba de factores de interferencias.



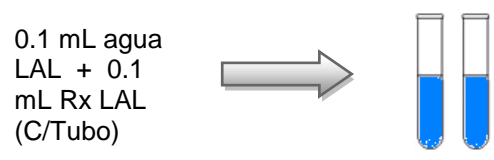
Serie C



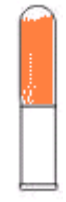
Incubar cada serie preparada a 37°C ± 1°C, durante 60 ± 2min.



Serie D



Invertir cada tubo 180°



Continuación Figura N° 18

5.2.5 La última prueba que se realizó fue la prueba de límite de coagulación de la muestra.

Cada analista preparó las siguientes series por duplicado

A. Solución de ensayo

Ya que los resultados de la prueba de interferencias mostraron q los resultados de la muestra y las diluciones no presentan interferencias se procedió a utilizar la muestra pura para este ensayo.

B. Control positivo del material de prueba o interferencias.

A una alícuota de solución A es decir la muestra sin diluir (0.05 mL) se le adicionó Control Estándar de Endotoxina a una concentración de 2λ (0.05 mL).

C. Control positivo

Control Estándar de Endotoxina a una concentración de 2λ .

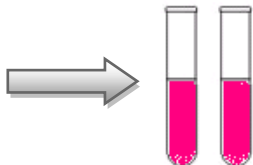
D. Control negativo de agua reactivo para LAL.

Agua libre de pirógenos.

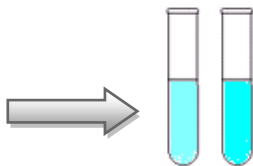
Tal como se presenta en la figura N° 19:

Serie A

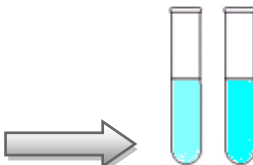
0.1 mL Mx +
0.1 mL Rx
LAL (C/Tubo)

**Serie B**

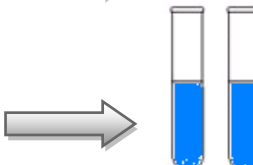
0.05 mL Mx +
0.05 mL 2λ +
0.1 mL Rx
LAL (C/Tubo)

**Serie C**

0.1 mL 2λ +
0.1 mL Rx
LAL (C/Tubo)

**Serie D**

0.1 mL agua
LAL + 0.1 mL
Rx LAL
(C/Tubo)



Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 60 ± 2 min.



Invertir cada tubo 180°



Figura N° 19 Esquema de prueba de límite de coagulación de muestra.

5.3 Interpretación y análisis de los resultados obtenidos para validar la prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel – Clot para el producto Furosemida (20 mg) inyectable.

Tabla N°4 Resultados de confirmación de sensibilidad de reactivo LAL

Lote: 510-02-528

Analista 1 Claudia Osorio	Nº de réplicas	2λ	λ	0.5λ	0.25λ
	1	+	+	-	-
	2	+	+	-	-
	3	+	+	-	-
	4	+	+	-	-
Analista 2	Nº de réplicas	2λ	λ	0.5λ	0.25λ
	1	+	+	-	-
	2	+	+	-	-
	3	+	+	-	-
	4	+	+	-	-
Analista 3	Nº de réplicas	2λ	λ	0.5λ	0.25λ
	1	+	+	-	-
	2	+	+	-	-
	3	+	+	-	-
	4	+	+	-	-

5.3.1 Cálculos de media geométrica para confirmación de sensibilidad.

La media geométrica de la concentración del punto final es la sensibilidad medida del reactivo LAL (en UE/mL)

Se llama punto final al último punto en el cual se lee un positivo. A este punto final se le calcula el logaritmo. Una vez se tengan los respectivos logaritmos se halla la sumatoria (Σ) y luego el promedio (X).

Con el valor del promedio (X) se calcula el promedio geométrico (GM) de la siguiente forma:

$$GM = \text{Antilogaritmo } (X)$$

Se calculó la sensibilidad del lisado de manera individual para cada analista, determinando el valor medio de los logaritmos de la concentración en el punto final y luego el antilogaritmo del valor medio como se describe a continuación:

Nº de réplicas	2λ	λ	0.5λ	0.25λ	Punto Final	Log 10 Punto Final
1	+	+	-	-	0.125	- 0.90309
2	+	+	-	-	0.125	- 0.90309
3	+	+	-	-	0.125	- 0.90309
4	+	+	-	-	0.125	- 0.90309
Sumatoria (Σ)						- 3.61236
Promedio (X)						- 0.90309

Calculo de Media Geométrica

$$GM = \text{Antilog}(X) \longrightarrow GM = \text{Antilog}(-0.90309)$$

GM= 0.125 UE/ml

5.3.2 Análisis de resultado de media geométrica para confirmación de sensibilidad.

La media geométrica debe encontrarse en el intervalo de $0,5\lambda$ a $2,0 \lambda$ (0.5-0.125 UE/mL) para confirmar la sensibilidad declarada en la etiqueta y ser utilizado en las pruebas. (1)

Con el resultado obtenido se confirma la sensibilidad declarada en la etiqueta del reactivo, lo cual indica que se puede proceder a utilizarlo en las pruebas subsecuentes de manera confiable.

La confirmación del lisado se realiza cada vez que se adquiera un nuevo lote de reactivo LAL y antes de ser usado en la prueba, tomando en cuenta que para realizar una validación debe usarse el mismo lote de reactivo para todo el proceso.

A continuación se presentan los resultados de prueba de interferencias:

Tabla N° 5 Resultados de prueba de interferencia, Analista Claudia Osorio

Analista: Claudia Osorio , L: E011G10																								
SERIE A					SERIE B														SERIE C					
Muestra	-	-	-	-	CEE	2λ				λ				0.5 λ				0.25 λ				2λ	+	+
					Mx																			
	-	-	-	-	Muestra	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	λ	+	+
1:2	-	-	-	-	1:2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5 λ	-	-
1:4	-	-	-	-	1:4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0.25 λ	-	-
1:8	-	-	-	-	1:8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	SERIE D		
1:16	-	-	-	-	1:16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:32	-	-	-	-	1:32	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:64	-	-	-	-	1:64	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:128	-	-	-	-	1:128	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:256	-	-	-	-	1:256	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Lwr*	-	-
1:512	-	-	-	-	1:512	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Lwr*	-	-

* Lwr : LAL reagent water. Agua despirogenada grado LAL

Tabla N° 6 Resultados de prueba de interferencia, Analista 2.

Analista 2, L: E011G10																								
SERIE A					SERIE B														SERIE C					
Muestra	-	-	-	-	CEE	2λ				λ				0.5 λ				0.25 λ				2λ	+	+
					Mx																		Λ	+
1:2	-	-	-	-	1:2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5 λ	-	-
1:4	-	-	-	-	1:4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0.25 λ	-	-
1:8	-	-	-	-	1:8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	SERIE D		
1:16	-	-	-	-	1:16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:32	-	-	-	-	1:32	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:64	-	-	-	-	1:64	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:128	-	-	-	-	1:128	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:256	-	-	-	-	1:256	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Lwr*	-	
1:512	-	-	-	-	1:512	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Lwr*	-	

* Lwr : LAL reagent water. Agua despirogenada grado LAL

Tabla N° 7 Resultados de prueba de interferencia, Analista 3.

Analista 3, L: E011G10																								
SERIE A					SERIE B														SERIE C					
Muestra	-	-	-	-	CEE	2λ				λ				0.5 λ				0.25 λ				2λ	+	+
					Mx																		λ	+
1:2	-	-	-	-	1:2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5 λ	-	-
1:4	-	-	-	-	1:4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0.25 λ	-	-
1:8	-	-	-	-	1:8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	SERIE D		
1:16	-	-	-	-	1:16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:32	-	-	-	-	1:32	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:64	-	-	-	-	1:64	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:128	-	-	-	-	1:128	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
1:256	-	-	-	-	1:256	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Lwr*	-	-
1:512	-	-	-	-	1:512	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Lwr*	-	-

* Lwr : LAL reagent water. Agua despirogenada grado LAL

5.3.3 Cálculos de media geométrica para prueba de interferencias.

Tomando en cuenta que la muestra y cada dilución fue probada por cuadruplicado el número de repeticiones totales (f) será = 4 y el cálculo de MG será el mismo ya que tanto la muestra como las diluciones obtuvieron el mismo punto final = λ (0.125 UE/mL)

Se calculó la media geométrica del punto final de la concentración de endotoxina, en el material de prueba tal y como se calculó en la confirmación de sensibilidad del reactivo con los datos obtenidos en la serie B

SERIE B		
Punto Final	Log₁₀ PF	
0.125	- 0.90309	
0.125	- 0.90309	
0.125	- 0.90309	Sumatoria: - 3.61236
0.125	- 0.90309	Promedio: - 0.90309

MG = Antilog (Promedio)

MG = Antilog (- 0.90309) \longrightarrow **MG = 0.125 UE/mL**

Además se calculo nuevamente la media geométrica para la serie C que indica el control de la confirmación de la sensibilidad del reactivo empleado, de la siguiente manera:

SERIE C						
Nº de réplicas	2λ	λ	0.5λ	0.25λ	Punto Final	Log 10 Punto Final
1	+	+	-	-	0.125	- 0.90309
2	+	+	-	-	0.125	- 0.90309
					Sumatoria (Σ)	- 1.80618
					Promedio	- 0.90309

MG = Antilog (Promedio)

MG = Antilog (- 0.90309) → **MG = 0.125 UE/ml**

5.3.4 Análisis de resultados para prueba de interferencias.

- La prueba de interferencias no es válida a menos que las soluciones A y D no muestren ninguna reacción y el resultado de la solución C confirme la sensibilidad declarada en la etiqueta.

Para los tres analistas el resultado de las series A y D son negativos ya que no se observó formación de coágulos.

Se calculó la media geométrica de la serie C a fin de confirmar la sensibilidad del reactivo y comprobándose mediante el resultado obtenido efectivamente la sensibilidad declarada del reactivo empleado.

- Si la sensibilidad del lisado determinada en presencia de la solución de muestra en análisis de la solución B no es menos de 0.5λ y no es mayor de 2λ la solución de muestra no contiene factores que interfieran en las condiciones experimentales utilizadas.

El punto final en la serie B y C es $0.125 \text{ UE/mL } (\lambda)$ y la media geométrica del lisado en presencia de la solución es de 0.125 UE/mL encontrándose que efectivamente la muestra no causa ninguna inhibición o realce al efectuarse la prueba.

Con este resultado se procede a la siguiente prueba, utilizando la muestra pura ya que se ha demostrado que no hay factores de interferencia.

A continuación se presentan los resultados de prueba de límite de coagulación:

Analista L: E011G10	Claudia Osorio				Analista 2				Analista 3			
N° de replicas	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
2	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-

- La prueba no es válida a menos que las series A y D no muestren ninguna reacción y el resultado de las series B y C sean positivos.

Debido a que en la prueba de inhibición y realce no se encontraron factores de interferencia se procedió a usar la muestra sin diluir en la prueba de limite de

coagulación, obteniéndose para las 3 analistas resultados negativos en las series A y D y resultados positivos en las series B y C, con lo que se puede concluir que la muestra no presenta endotoxinas bacterianas en cantidad menor a 0.125 Unidades de Endotoxinas por mililitro de principio activo y que el método empleado ha sido correctamente verificado para tomarse como confiable el resultado usando la muestra sin diluir.

5.4 Elaboración del informe y certificado de validación como documentación final que certifica el proceso de validación del método LAL para el producto Furosemida (20 mg) inyectable.

Se elaboró un informe del proceso completo de validación que incluyó los siguientes datos:

- Fecha de inicio y finalización del estudio.

Indicó el período completo del proceso de validación.

- Observaciones efectuadas

Se enumeran los hechos característicos observados durante la realización de los ensayos, por ejemplo: cambios de color, cambios de pH, etc.

- Criterios de aceptación

Se argumentó nuevamente los criterios de aceptación que se plantearon anteriormente para las pruebas requeridas para validar el proceso: confirmación de sensibilidad del reactivo y prueba de factores de interferencia inhibición / realce.

- Resultados de análisis efectuados

Se incluyen los resultados obtenidos para los tres lotes, realizados por los 3 analistas en una manera comparativa a través de cuadros, como sigue en la siguiente tabla.

Tabla N°8 Resultados de análisis de validación Furosemida PL Lote: E011G10

LOTE	ANALISTA	PRUEBA	RESULTADO	CRITERIO
E011G10	Claudia Osorio	Confirmación de sensibilidad	MG: 0.125 UE/ml	MG: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	- Tubos de serie A y D: negativos. - MG _{muestra} : 0.125 UE/ml - MG _{diluciones} : 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos. MG:0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivos.	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.

LOTE	ANALISTA	PRUEBA	RESULTADO	CRITERIO
E011G10	Analista 2	Confirmación de sensibilidad	MG: 0.125 UE/ml	MG: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	- Tubos de serie A y D: negativos. - MG _{muestra} : 0.125 UE/ml - MG _{diluciones} : 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos. MG:0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivos.	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.
	Analista 3	Confirmación de sensibilidad	MG: 0.125 UE/ml	MG: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	- Tubos de serie A y D: negativos. -MG _{muestra} : 0.125 UE/ml -MG _{diluciones} : 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos MG:0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivos.	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.

Continuación de Tabla N°8

5.4.5 Análisis de resultados

Se interpretaron los resultados obtenidos en las diferentes pruebas: confirmación de sensibilidad de reactivo LAL y prueba de interferencias.

5.4.6 Informe de desviaciones

Se incluye el registro de cualquier cambio requerido en la realización del ensayo como desviación si hubiera o bien se declara que no hubo desviaciones.

5.4.7 Fecha de revalidación.

Se definió los casos en los que la revalidación del proceso se llevaría a cabo, siendo estas circunstancias que modifiquen características críticas como fórmula y composición del producto, cambio de metodología analítica o modificación en el límite de endotoxinas.

Posterior a esto se elaboro el certificado de validación que incluye un resumen de los resultados obtenidos que argumentan que la prueba es válida para el uso rutinario:

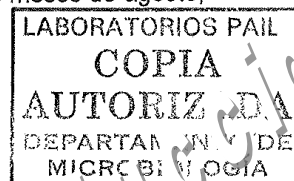
Habiendo realizado el análisis de tres lotes del producto y por los resultados obtenidos: se confirma la sensibilidad del reactivo usado lote 510-02-528 y se concluye que la prueba de endotoxinas por el método gel clot para el producto Furosemida PL fabricado por Laboratorios Paill es válida usando la muestra sin diluir.

A continuación se presenta el informe y certificado de validación realizados.

Informe de Validación de la prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel-Clot para el producto Furosemida PL 20mg/2 mL Solución inyectable.

Inicio del estudio: Julio 2010

Finalización del estudio: Noviembre 2010, no incluyendo los meses de agosto, septiembre y octubre.



Observaciones efectuadas:

- se utiliza un control de agua desmineralizada para introducir en la prueba de límite de coagulación (ejecutada rutinariamente con un control positivo en sustitución del CEE a concentración de 2λ.
- Se presenta variación en el pH de la muestra y la concentración de muestra de los diferentes lotes analizados, presentando una disminución de una y dos unidades en la escala por cada dilución efectuada.

Criterios de aceptación:

La validez de los resultados obtenidos de la determinación de endotoxina bacterianas, requiere de una demostración adecuada de que el reactivo LAL cumpla con la sensibilidad que declara en su etiqueta y en su certificado de calidad; así como de demostrar que el material de prueba al cual se le aplica este método no inhibe ni aumenta la reacción, ni causa otro tipo de interferencia con la prueba, por lo que se realizó la *prueba de factores de interferencias*, la cual incluye la *verificación de la sensibilidad del reactivo LAL*, siendo estas dos pruebas los parámetros requeridos para validar que la muestra ya sea directa y/o



- *Prueba de intererencias*

Esta prueba no es valida a menos que las soluciones A (muestra y diluciones) y D (control negativo) no muestren ninguna reacción y el resultado de la solución C confirme la sensibilidad declarada en la etiqueta. Si la sensibilidad del lisado determinada en presencia de la solución de muestra en análisis de la solución B esta en el rango de 0.5λ y 2λ ($0.06 - 0.25$ UE/ml) para confirmar la sensibilidad declarada en la etiqueta, la solución de muestra no contiene factores que interfieran en las condiciones experimentales utilizadas. En caso contrario, la solución de muestra que se va a examinar interfiere con la prueba y se puede realizar nuevamente la prueba empleando una dilución mayor que no exceda la MDV.

- *Prueba de límite de coagulación de la muestra*

La prueba no es valida a menos que ambas determinaciones repetidas las soluciones B y C sean positivas y la solución D sea negativa. La coagulación en análisis cumple con la prueba si se obtiene un resultado negativo en ambos tubos que contienen la solución A.

Resultados de análisis efectuados:

Los lotes sometidos a dicha prueba son:

Lote: E069E10	Fabricación: 05/10	Vence: 05/13
Lote: E011G10	Fabricación: 06/10	Vence: 06/13
Lote: E026J	Fabricación: 08/10	Vence: 08/13

Se realizó un control positivo de agua desmineralizada en cada análisis efectuado para cada lote ensayado y por cada analista el cual dio el resultado positivo esperado de manera continua en cada ensayo realizado.

LOTE	ANALISTA	PRUEBA	RESULTADO	CRITERIO
E069E10	Claudia Osorio	Confirmación de sensibilidad	GM: 0.125 UE/ml	GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	- Tubos de serie A y D: negativos. - GM muestra: 0.125 UE/ml - GM diluciones: 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos. GM:0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivos.	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.
	Judith Zavaleta	Confirmación de sensibilidad	GM: 0.125 UE/ml	GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	- Tubos de serie A y D: negativos. -GM muestra: 0.125 UE/ml -GM diluciones: 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos. GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivo	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.
	Lic. Margarita Cora	Confirmación de sensibilidad	GM: 0.125 UE/ml	GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	Tubos de serie A y D: negativos. -GM muestra: 0.125 UE/ml -GM diluciones: 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos GM:0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivos.	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.

LOTE	ANALISTA	PRUEBA	RESULTADO	CRITERIO
E011G10	Claudia Osorio	Confirmación de sensibilidad	GM: 0.125 UE/ml	GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	- Tubos de serie A y D: negativos. - GM muestra: 0.125 UE/ml - GM diluciones: 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos. GM:0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivos.	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.
	Judith Zavaleta	Confirmación de sensibilidad	GM: 0.125 UE/ml	GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	- Tubos de serie A y D: negativos. -GM muestra: 0.125 UE/ml -GM diluciones: 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivos.	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.
	Lic. Margarita Cordero	Confirmación de sensibilidad	GM: 0.125 UE/ml	GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	- Tubos de serie A y D: negativos. -GM muestra: 0.125 UE/ml -GM diluciones: 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos GM:0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivos.	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.

LOTE	ANALISTA	PRUEBA	RESULTADO	CRITERIO
E026J10	Claudia Osorio	Confirmación de sensibilidad	GM: 0.125 UE/ml	GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	- Tubos de serie A y D: negativos. - GM muestra: 0.125 UE/ml - GM diluciones: 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos. GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivos.	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.
	Judith Zavaleta	Confirmación de sensibilidad	GM: 0.125 UE/ml	GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	- Tubos de serie A y D: negativos. -GM muestra: 0.125 UE/ml -GM diluciones: 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivos.	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.
	Lic. María Victoria Córdoba	Confirmación de sensibilidad	GM: 0.125 UE/ml	GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de interferencias:	- Tubos de serie A y D: negativos. -GM muestra: 0.125 UE/ml -GM diluciones: 0.125 UE/ml	Tubos de serie A y D: negativos GM: 0.5 – 2 λ
		Prueba de límite de coagulación:	- Tubos de serie A y D: negativos. - Tubos de serie B y C: positivos.	Tubos de serie A y D: negativos Tubos de serie B y C: positivos.

Análisis de resultados

- *Confirmación de sensibilidad:*

El reactivo usado rotula una sensibilidad de 0.125 UE/ml, la sensibilidad del reactivo se confirma ya que se encuentra dentro del rango establecido.

- *Prueba de interferencias*

Las muestras y diluciones de muestras de los tres lotes ensayados no presentan interferencia que cause la inhibición de la formación de coágulo en presencia de las diferentes concentraciones de control estándar preparadas o que induzca la misma aun sin presencia de endotoxinas bacterianas.

Por tales resultados se determina que tanto las diluciones como la muestra sin diluir pueden ser utilizadas para realizar la prueba de manera rutinaria ya que no se ve afectada por ningún factor que potencie o inhiba la detección de endotoxinas bacterianas, recomendando el uso de la muestra sin diluir a fin de reducir costos de análisis.

Se presentó variación en el valor de la muestra y las diluciones de muestra de los diferentes lotes analizados, presentando una disminución de una y dos unidades en la escala por cada dilución efectuada, los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

TABLA N° 1: Valores de pH de muestra y diluciones de muestra de lotes ensayados

Dilución	L: E069E10			L: E011G10			L:E026J10		
Muestra	8	8	8	9	9	9	8	8	8
Dil. 1/2	7	7	7	8	8	8	7	8	7
Dil. 1/4	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Dil. 1/8	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Dil. 1/16	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Dil. 1/32	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Dil. 1/64	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dil. 1/128	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dil. 1/256	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Dil. 1/512	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Informe de desviaciones:

No se presentaron desviaciones en el proceso de análisis.

Fecha de revalidación:

Se procederá a revalidar el proceso cuando:

- Se efectuó modificación de la fórmula del producto.
- Se cambie metodología de análisis.
- Se modifique el límite de seguridad del producto.

Certificado de validación de la prueba de endotoxina bacteriana por el método Gel-Clot para el producto Furosemida PL 20mg/2mL Solución Inyectable.

Habiendo realizado el análisis de tres lotes del producto y por los resultados obtenidos: se confirma la sensibilidad del reactivo usado lote 510-02-528 y se concluye que la prueba de endotoxinas por el método gel clot para el producto Furosemida PL fabricado por Laboratorios Paillón es válida usando la muestra sin diluir, además que se puede utilizar como control positivo agua desmineralizada para la prueba de límite de coagulación que se ejecuta rutinariamente en sustitución del CEE a una concentración de 2λ de manera confiable.

Por lo tanto la prueba de endotoxinas por el método gel clot para el producto FUROSEMIDA PL 20mg/2mL Solución inyectable se considera VALIDADA



Responsables del informe y certificado de validación:

Gerente A. de C.	Jefa de Microbiología	Cláudia Osorio Químico Analista	Técnico de microbiología



5.5 Entrega de tres recopilaciones del proceso de validación ejecutado a las cátedras de Control de Calidad de productos farmacéuticos y veterinarios I y Microbiología Aplicada III respectivamente para que contribuya a la formación académica de los estudiantes de la facultad de Química y Farmacia en el tema de validación de métodos analíticos microbiológico.

Se elaboro una recopilación de los pasos a seguir para efectuar el proceso de validación del método, incluyendo la información completa de la prueba de endotoxinas bacterianas, su historia, sus principios biológicos, así como los diferentes métodos de detección de endotoxinas bacterianas y aspectos de validación de métodos analíticos incluyendo los tipos de validación y aspectos acerca de cómo se pueden validar, métodos, procesos y sistemas, entre otros; para crear una base de ambos temas relacionados entre sí al proceso efectuado, se detallo la metodología a seguir paso a paso para el método gel – clot, así como la manera de ejecutarlo e interpretar los resultados obtenidos, como resultado se obtuvo el material denominado: *manual de proceso de validación de la prueba de endotoxina bacteria por el método gel – clot*, y de la cual se entregaron 3 ejemplares a las cátedras de Control de Calidad de productos farmacéuticos (humanos y veterinarios) I y Microbiología Aplicada III respectivamente.

Las cartas de entrega de los materiales respectivos a cada coordinador de cátedra se presentan en el anexo N° 10.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Redactar un protocolo de validación antes de iniciar el proceso de validación de un método analítico permite plantear las metodologías y pasos a seguir durante la ejecución del mismo, además de identificar puntos críticos y permitir buscar alternativas de solución a estos, asimismo es una herramienta capaz de mostrar cada uno de los requisitos mínimos a cumplir requeridos para la realización de dicho proceso, los lineamientos bajo los cuales ha sido ejecutado y demostrar que la metodología empleada es capaz de dar resultados confiables y reproducibles a futuro.
2. Se argumentaron las características de funcionamiento, instalación, calibración y uso de los equipos relacionados a la validación en vista de la falta de cualificaciones de los equipos relacionados dentro del laboratorio al momento de la validación, a fin de dejar constancia de que a pesar de no poseer procesos de calificación el laboratorio cumple con tales características a pesar de no poseer las cualificaciones realizadas.
3. Se debe realizar los cálculos de MDV y cascadas de dilución para preparación de diluciones de CEE y muestra con tiempo de anticipación a fin de disminuir errores en la técnica empleada y prever las cantidades requeridas de materiales y reactivos para la ejecución completa y sin interrupción de cada ensayo.
4. A través del cálculo de la media geométrica se obtuvo la confirmación de la sensibilidad del reactivo empleado en el proceso de validación, siendo este un factor crucial en el desarrollo de los ensayos dando la

confiabilidad de que el reactivo empleado cumple la detección de endotoxinas bacterianas tal como lo indica su certificado.

5. Por los resultados obtenidos en la prueba de factores de interferencia se concluye que el producto Furosemida 20 mg Solución inyectable, producida en Laboratorios Paill no presenta ningún factor que interfiera con la prueba ya sea inhibiendo la formación de coagulo o induciéndola.
6. Por los resultados obtenidos en la prueba de límite de coagulación se verifica la ausencia de endotoxinas bacterianas en cantidad menor a 0.125 Unidades de Endotoxinas por mililitro de producto.
7. El proceso de validación se concluyó con la elaboración de un informe y un certificado de validación que refleja y hace constar que los resultados obtenidos son reales y confiables, este material hace valida la prueba de endotoxinas bacterias por el método gel clot para el producto Furosemida 20 mg Solución inyectable.
8. Con la elaboración del manual del proceso de validación como material de apoyo para los estudiantes de las cátedras de Microbiología Aplicada III y Control de calidad de productos farmacéuticos (humanos y veterinarios) I; se contribuyó en la incorporación de habilidades y destrezas acerca de la metodología Gel- Clot para detección de endotoxinas bacterianas y la ejecución de un proceso de validación del método.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Que los laboratorios farmacéuticos que procedan a ejecutar procesos de validación elaboren previo al inicio del proceso los protocolos de validación respectivos a los productos que se programen.
2. Implementar procesos de calificación de equipos dentro de los laboratorios farmacéuticos que estén en proceso de ejecutar validaciones de metodologías analíticas ; ya que estos son requisitos exigidos para la sustentación de las operaciones o procesos involucrados en metodologías de análisis que se ejecutan a través de dichos equipos, los cuales deben adjuntarse a los respectivos procesos de validación.
3. Realizar ensayos previos a la validación con cada analista a fin de lograr la adaptación a la metodología en general.
4. Verificar la compatibilidad entre el Lisado de amebocitos y el control Estandar previo a la adquisición de los mismos a fin de trabajar bajo una relación que permita el empleo y equivalencia correcto de la técnica y confirmar la sensibilidad del lisado de amebocitos con anticipación a la realización de los ensayos.
5. Emplear el producto Furosemida 20 mg Solución inyectable, producida en Laboratorios Paill en ensayos con fines didácticos en relación a la aplicación de la prueba de endotoxinas bacterianas por el método gel – clot ya que se ha demostrado por los resultados satisfactorios obtenidos en los ensayos realizados que presenta características apropiadas para la ejecución de dicho método.

6. Dejar constancia de los resultados finales de los procesos de validación a través de documentos formales que certifiquen a los mismos tales como: el informe y el certificado de validación.
7. Utilizar este proceso de validación como una guía que pueda orientar a los estudiantes de La Licenciatura en química y farmacia en cuanto a los procesos que implica la validación de métodos analíticos, y en cuanto al entendimiento de la prueba de endotoxinas bacterias por el método Gel-Clot dentro de las cátedras de Microbiología Aplicada III y Control de Calidad de Productos Farmacéuticos (Humanos y Veterinarios) I.
8. Fortalecer la relación que existe entre la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y la empresa privada para que en un futuro se pueda aplicar el desarrollo de los procesos de validación del método gel – clot con mayor facilidad dentro de la formación académica de los estudiantes de la carrera.

BIBLIOGRAFIA

1. Aldana D, Arias J, Carrillo C, Echeverri C y Ospina J. 2006. Valoración de endotoxinas bacterianas en Ranitidina y Penicilina G sódica inyectable mediante la prueba de lisado del amebocito de *Limulus*. Universitas Scientiarum. 11 (1).15 – 28
2. Allen S, Dowell VR, Koneman E y Sommers H. 1992. Diagnóstico Microbiológico. 3ed. Buenos Aires. Editorial Panamericana. P 2451
3. Arias J, Fernández C, Osorio O, Pérez X y Rodríguez D. 2007. “Interferencias en la validación del ensayo de Lisado de Amebocitos de *Limulus* para oxitetraciclina 50 mg/mL” Revista Cubana de Farmacia v.41 n.1.
4. Fauli Trillo. 1993. Farmacia Galénica. 1ed. Madrid. Editorial Madrid. p 1193.
5. Handal S. R y Serpas Z. J. 1984 “Determinación de pirógenos en inyectables muestreados de la industria farmacéutica nacional”. Tesis para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.
6. Klein D y Prescott L. 1999. Microbiología. 4ed. España, Editorial Mc Graw Hill Interamericana. p 230 -246
7. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27ed, p. 13-18.

8. Novitsky T. 1989. Pyrotell : Limulus amebocyte lysate, LAL update. 7ed, V2, p 153-157.
9. Perdomo R. 2004 “Ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL) Revista cubana de farmacia v. 38 n. 1.
10. Ramírez J. y Valle J. 2002. “seminario taller: metodología para la validación de análisis de medicamentos y cálculos estadísticos”. Laboratorio de control de calidad de medicamentos MSPAS. San Salvador. P 23 – 56.
11. USP (Farmacopea de los Estados Unidos).2004. Prueba de endotoxina bacteriana, apartado <85> . 27ed NF 22. p 2169 – 2173.
12. USP (Farmacopea de los Estados Unidos). 2004. Microbiological evaluation of Clean Rooms and other Controlled Enviroment, Apartado <1116>. 27 ed. NF 22. p 2559 – 2563.
13. USP (Farmacopea de los Estados Unidos).2007. Inyectables, Apartado general <1>. 30 ed. - NF 25, p. 33.
14. USP (Farmacopea de los Estados Unidos). 2009. Validación de métodos farmacopéicos. Capítulo General <1225>. 32 ed. – NF27.
15. Walker T. 1998. Microbiología. MacGraw-Hill Interamericana. México. P 9-23, 274.
16. Zinsser H. 1997. Microbiología. 20ed. Buenos Aires. Editorial Panamericana. p 957.

17. Aguilera N, Calera J, Giraldo J y Gómez J. 1999 “E l Dilema de los Estériles”.
<http://dspace.icesi.edu.co/dspace/bitstream/item/236/1/naguilera-jcalero-jgiraldo-fgomez_dilema-esteriles.pdf> [Consultado 20.3.2010]

18. Alonso H. Sistema de Validación para un Proceso de Fabricación de Ingrediente Farmacéutico Activo. de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas.
<<http://biblioteca.idict.villaclara.cu/UserFiles/File/feria2006/Trabajo%2027.doc>> [Consultado 13.3.2010]

19. Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. Validación de métodos analíticos. Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico. Anexo 3 informe 36, 2002. <www.who.int/medicines/publications/pharmprep/en> [Consultado 15.3.2010]

20. Farmacopea Argentina. 2003. Ensayos de esterilidad, apartado 370. 7ª ed. Boletín Oficial de la República de Argentina Nº 30.172 primera sección p. 48 – 50. 138p.
<http://www.salutia.com.ar/sitio/sp/servicios/Vademecum/Farmacopea_Argentina/Drogas/sp_Vademecum_Farmacopea_Drogas_C.htm> [Consultado 1.5.2010]

21. FDA (Food and Drug Administration). 1987. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

<www.fda.gov/downloads/.../Guidances/Blood/UCM080966.pdf>
[Consultado 12.3.2010]

22. Kaiser G. 1999. The Grapes of Staph A Microbiology Lab Manual.
<<http://www.cat.cc.md.us/courses/biol230labmanua,1999>> [Consultado
3.3.2010]

23. Laboratorios Lavoisier S.A. de C.V, Paris. Información farmacológica de
Furosemida.
<[http://www.lavoisier.com/fic_bdd/pdf_es_fichier/12133488250_Furosemi
da.pdf](http://www.lavoisier.com/fic_bdd/pdf_es_fichier/12133488250_Furosemi
da.pdf)> [Consultado 20.12. 2010]

24. L&S Consultores C.A. Validación de metodos de ensayo. Nota Técnica,
NT 004/03. <www.lysconsultores.com/Descargar/NT004.pdf>
[Consultado 2.3.2010]

25. Melo Florián A. 2008. Lisado de amebocito de Limulus.
<[http://knol.google.com/k/alejandro-melo-flori%C3%A1n/lisado-de-
amebocito-de-limulus/3sktw3ldc86j2/19#](http://knol.google.com/k/alejandro-melo-flori%C3%A1n/lisado-de-
amebocito-de-limulus/3sktw3ldc86j2/19#)> [Consultado 28.3.2010]

26. Ministerio de sanidad y consumo, Agencia Española de medicamentos y
productos sanitarios. España. Anexo 15: cualificación y validación.
<www.aemps.es/actividad/sglInspeccion/docs/28-anexo15.pdf>
[Consultado 26.3.2010]

27. Ministerio de salud pública y asistencia social. Reglamento de Buenas
Prácticas de Manufactura de la industria farmacéutica. Resolución No 93
– 2002 COMIECO XXIV.

<http://portal.mspas.gob.gt/images/files//MarcoLegal/Medicamentos/AC_506_2002.pdf> [Consultado 15.3. 2010.]

28. Organización Panamericana de la Salud. Taller de validación de procesos OMS Guatemala. 2004. <www.paho.org/Spanish/AD/.../bpm-validacion-procesos-fda.ppt> [Consultado 3.3.2010]

29. Solís Asencios J. 2004.. “Validación de la prueba de endotoxina bacteriana por el método LAL (Lymulus ameocyte lysate) por el método de Gel Clot en clindamicina 600 mg inyectable” Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. Lima Perú. Universidad Mayor de San Marcos.

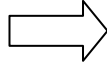
<http://dspace.icesi.edu.co/dspace/bitstream/item/236/1/naguilera-jcalero-jgiraldo-fgomez_dilema-esteriles.pdf> [Consultado 28.2.2010]

30. Universidad de Chile, 2005 “Estudio preliminar para la validación de los procedimientos de determinación de endotoxinas bacteriana y esterilidad en soluciones parenterales” Disponible en: <www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2005/vidal_l/sources/vidal_l.pdf> [Consultado 3.3.2010.]

ANEXOS

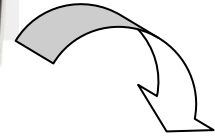
ANEXO N° 1

Lavado de ampollas abiertas

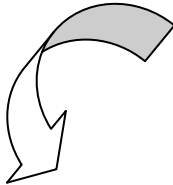


esterilización por calor seco

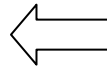
250° x 2 horas



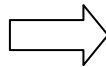
Esterilización de la solución por filtración en cabina de flujo laminar



Manufactura de la solución Inyectable



Envasado y sellado de ampollas



Pruebas de control de calidad:
Hermeticidad y ausencia de partículas



Empaque y distribución



Figura N° 20 Esquema de manufactura de productos inyectables

ANEXO N° 2

**GUÍA DE VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE LISADO DE
AMEBOCITOS DE LIMULUS COMO LA PRUEBA DE ENDOTOXINAS
DE PRODUCTOS TERMINADOS PARA USO PARENTERAL EN
HUMANOS Y ANIMALES, PRODUCTOS BIOLÓGICOS Y
DISPOSITIVOS MÉDICOS; DE LA FDA.**



**GUIDELINE ON
VALIDATION OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST
AS AN END-PRODUCT ENDOTOXIN TEST FOR HUMAN
AND ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS, AND
MEDICAL DEVICES**

**U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
PUBLIC HEALTH SERVICE
FOOD AND DRUG ADMINISTRATION**

**GUIDELINE ON
VALIDATION OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST
AS AN END-PRODUCT ENDOTOXIN TEST FOR HUMAN
AND ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS, AND
MEDICAL DEVICES**

December 1987

Prepared by: Center for Drug Evaluation and Research
Center for Biologic Evaluation and Research
Center for Devices and Radiological Health
Center for Veterinary Medicine

Maintained by: Division of Manufacturing and Product Quality (HFN-320)
Office of Compliance
Center for Drug Evaluation and Research
Food and Drug Administration
5600 Fishers Lane
Rockville, MD 20857

INTRODUCTION

This guideline sets forth acceptable conditions for use of the Limulus Amebocyte Lysate test. It also describes procedures for using this methodology as an end-product endotoxin test for human injectable drugs (including biological products), animal injectable drugs, and medical devices. The procedures may be used in lieu of the rabbit pyrogen test.

For the purpose of this guideline, the terms "lysate" or "lysate reagent" refer only to Limulus Amebocyte Lysate licensed by the Center for Biologic Evaluation and Research. The term "official test" means that a test is referenced in a United States Pharmacopeia drug monograph, a New Drug Application, New Animal Drug Application or a Biological License.

CONTENTS

I. BACKGROUND.....	4
II. LEGAL EFFECT OF THE GUIDELINE.....	6
III. REGULATORY PROVISIONS THAT PERMIT INITIATION OF END- PRODUCT TESTING WITH LAL.....	7
IV. HUMAN AND ANIMAL DRUGS AND BIOLOGICAL PRODUCTS.....	9
A. Validation of the LAL Test.....	9
B. Routine Testing of Drugs by the LAL Test	11
V. MEDICAL DEVICES.....	14
A. Validation of the <i>LAL</i> Test.....	14
B. ROUTINE TESTING OF DEVICES BY THE LAL TESTS.....	17
VI. APPENDICES.....	19
APPENDIX A: INITIAL QUALITY CONTROL.....	20
APPENDIX B: BACTERIAL ENDOTOXINS TEST UNITED STATES PHARMACOPEIA XXI/NATIONAL FORMULARY XVI AND FIRST SUPPLEMENT TO USP XXI/N XVI.....	21
APPENDIX C: DETERMINATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE CONTROL STANDARD ENDOTOXIN (CSE) AND THE REFERENCE STANDARD ENDOTOXIN (RSE).....	26
APPENDIX D.....	29
APPENDIX E.....	32

I. BACKGROUND

In a notice of January 12, 1973 (38 FR 1404), FDA announced that Limulus Amebocyte Lysate (LAL), derived from circulating blood cells (amebocytes) of the horseshoe crab, (*Limulus polyphemus*), is a biological product.

As such, it is subject to licensing requirements as provided in section 351 of the Public Health Service Act (42 U.S.C. 262). Since 1973, LAL has proved to be a sensitive indicator of the presence of bacterial endotoxins (pyrogens). Because of this demonstrated sensitivity, LAL can be of value in preventing the administration or use of products which may produce fever, shock, and death if administered to or used in humans or animals when bacterial endotoxins are present.

When the January 12, 1973 notice was published, available data and experience with LAL were not adequate to support its adoption as the final pyrogen test in place of the rabbit pyrogen test, which had been accepted and recognized for many years. In order to establish a data base and gain experience with the use of LAL, that notice permitted the introduction of LAL into the marketplace without a license. This was upon the condition that its use be limited to the in-process testing of drugs and other products, that the decision to use it be reached voluntarily by affected firms, and the labeling on LAL state that the test was not suitable as a replacement for the rabbit pyrogen test.

Since that time, production techniques have been greatly improved and standardized so that they consistently yield LAL with an endotoxin sensitivity over 100 times greater than originally obtained. Moreover, it is widely recognized that the LAL test is faster, more economical, and requires a smaller volume of product than does the rabbit pyrogen test. In addition, the procedure is less labor intensive than the rabbit test, making it possible to perform many tests in a single day.

In a notice published in the Federal Register of November 4, 1977 (42 FR 57749), FDA described conditions for the use of LAL as an end-product test for endotoxins in human biological products and medical devices. The notice stated further that the application of LAL testing to human drug products would be the subject of a future Federal Register publication.

The then Bureau of Medical Devices, now FDA's Center for Devices and Radiologic Health (CDRH), issued recommended procedures for the use of LAL testing as an end-product endotoxin test on March 26, 1979. These procedures were revised as a result of the comments received from interested parties .

As a direct result of CDRH's experience in approving petitions for the use of the LAL test in place of the rabbit pyrogen test, several procedures for using the LAL test have evolved and have been adopted for devices.

In the FEDERAL REGISTER of January 18, 1980 (45 FR 3668), FDA announced the availability of a draft guideline that set forth procedures for use of the LAL test as an end-product testing method for endotoxins in human and animal injectable drug products. This draft guideline was made available to interested parties to permit manufacturers, especially those who had used the LA test in parallel with the rabbit pyrogen test, to submit data that could be considered in the preparation of any final guideline.

In response to comments received on the January 18 draft guideline, FDA made several significant changes (i.e. Endotoxin limits changed and deletion of section on Absence of Non-endotoxin Pyrogenic Substances), and many minor editorial changes. The agency also determined that a single document should be made available covering all FDA regulated products that may be subject to LAL testing. Primarily because of the addition of biological products and medical devices to the guideline, the agency made, in the FEDERAL REGISTER of March 29, 1983 (43 FR 13096), another draft of the guideline available for public comment.

Based on the comments received on the March 29 draft guideline, FDA has made several changes in this final guideline. The comments used in support of these changes may be viewed at FDA's Dockets Management Branch, Room 4-62, 5600 Fishers Lane, Rockville, MD between 9 am and 4 pm Monday through Friday. Briefly, the significant changes made are:

A. Inclusion of validation criteria for the chromogenic, endpoint-turbidimetric and kinetic-turbidimetric LAL techniques.

B. Any technique (gel-clot, chromogenic or turbidimetric) can be used in testing a product for endotoxin. However, if a gel-clot lysate is used in a different technique the results must be interpreted using the criteria for the technique being used.

C. Elimination of the requirement to test the sensitivity of a rabbit pyrogen testing colony.

D. The Center for Devices and Radiological Health (CDRH) has adopted the USP Endotoxin Reference Standard and revised the limit expressions from ng/mL to EU/mL. The new limit for medical devices is 0.5 EU/mL except for devices in contact with cerebrospinal fluid for which the limit is 0.06 EU/mL. These limits for devices are equivalent to those for drugs for a 70 Kg man when consideration is given to the following:

1. In the worst case situation, all endotoxin present in the combined rinsings of 10 devices could have come from just one device. A wide variation in bioburden is common to some devices.

2. Published FDA studies indicate that less than half of added endotoxin is recovered from devices using a non-pyrogenic water rinse.

E. The Center for Drug Evaluation and Research (CDER) has added a listing of the maximum doses per Kg per hour and the corresponding endotoxin limits for most of the aqueous injectable, drugs and biologics currently on the market. This listing was added to promote uniformity among companies making the same product

II. LEGAL EFFECT OF THE GUIDELINE

This guideline is issued under section 10.90(b) (21 CFR 10.90(b)) of FDA's administrative regulations, which provides for use of guidelines to outline procedures or standards of general applicability that are acceptable to FDA for a subject matter within its statutory authority. Although guidelines are not legal requirements, a person who follows an agency guideline may be assured that the procedures or standards will be acceptable to FDA.

The following guideline has been developed to inform manufacturers of human drugs (including biologicals), animal drugs, and medical devices of procedures FDA considers necessary to validate the use of LAL as an end-product endotoxin test. A manufacturer who adheres to the guideline would be considered in compliance with relevant provisions of the applicable FDA current good manufacturing practice regulations (CGMP) for drugs and devices and other applicable requirements. As provided in 21 CFR 10.90(b), persons who use methods and techniques not provided in the guideline should be able to adequately assure, through validation, that the method or technique they use is adequate to detect the endotoxin limit for the product.

III. REGULATORY PROVISIONS THAT PERMIT INITIATION OF END-PRODUCT TESTING WITH LAL

The regulatory provisions that a firm must meet before using the LAL test as an end-product test are not the same for all categories of products because of the different applicable statutory provisions and regulations.

These provisions are as follows:

A. Human Drugs subject to New Drug Applications (NDAs) or Abbreviated New Drug Applications (ANDAs), Antibiotic Drug Applications, and animal drugs subject to New Animal Drug Applications (NADAs) and Abbreviated New Animal Drug Application,.

For these classes of drugs, manufacturers are to submit a supplemental application to provide for LAL testing. However, under 21 CFR 314.70(c) for drugs for human use and 21 CFR 514.8(d)(3) for drugs for animal use various changes may be made before FDA approval. Under these sections changes in testing of a human or animal drug that give increased assurance that the drug will have the characteristics of purity it purports or is represented to possess should be placed into effect at the earliest possible time. Therefore, if a firm validates the LAL test for a particular drug product covered by a new drug application by the procedures in this guideline using a LAL reagent licensed by the Center for Biologic Evaluation and Research (CBER) for the technique being used, the change may be made concurrently with the submission of the supplement providing for it. The supplement should contain initial quality control data, inhibition/enhancement data and the endotoxin limit for the drug product.

B. Biological Products for human use.

Under 21 CFR 601.12 significant changes in the manufacturing methods of biological products are required to be reported to the agency and may not

become effective until approved by the Director, CBER. Therefore, a manufacturer of a biological product shall obtain an approved amendment to its product license before changing to the use of LAL in an end-product test, irrespective of the validation procedure used.

C. Drugs not subject to pre-market approval.

A manufacturer of an injectable drug for human or animal use that is not subject to pre-market approval would be able to use the LAL test as an end-product test for endotoxins without submitting any information to the agency. CGMPs require the manufacturer to have data on file to validate the use of the LAL test for each product for which it is being used.

D. Medical Devices.

On the basis of extensive experience in review of LAL data on devices since November 1977, CDRH believes that the LAL test, when validated according to this guideline, is at least equivalent to the rabbit pyrogen test as an end-product test for medical devices. A manufacturer labeling a device as non-pyrogenic must validate the LAL test for that device in the test laboratory to be used for end-product testing before using the LAL test as an end-product endotoxin test for any device. The data discussed under Section V of this guideline may be expressed graphically or in tabular form and should be on file at the manufacturing site; no pre-clearance prior to use of the LAL test as an end-product test is required if it is used according to this FDA guideline. Voluntary submission of LAL validation and inhibition data obtained following issuance of this guideline will be accepted for CDRH review and comment.

When a manufacturer plans to use LAL test procedures that deviate significantly from the LAL guideline, a premarket notification under section 510(k) of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (the Act) or a Pre-market

Approval Application (PMA) supplement under section 515 of the Act should be submitted. Significant deviations would include-but not necessarily be limited to-- higher endotoxin concentration release criteria, sampling from fewer than three lots for inhibition/enhancement testing, lesser sensitivity to endotoxin, rabbit retest when the LAL method shows endotoxin above the recommended allowable endotoxin dose, and a device rinsing protocol resulting in greater dilution of endotoxin than that recommended in this guideline. CDRH will also consider submissions in the form of a pre-market notification or PMA supplement for another deviation from this draft guideline; process control of endotoxin contamination with reduced end-product testing, i.e., a decrease in the number of devices per lot undergoing end-product testing. The manufacturer must demonstrate adequate control of the production process by the use of routine checks for endotoxin at key stages of production except where it has been shown that no possibility of contamination exists.

To facilitate subsequent PMA review, providers of investigational devices subject to 21 CFR part 812 or 813 are encouraged to use this guideline when a non-pyrogenic device is to be manufactured.

IV. HUMAN AND ANIMAL DRUGS AND BIOLOGICAL PRODUCTS

GENERAL REQUIREMENT

Manufacturers shall use an LAL reagent licensed by CBER in all validation, in-process, and end-product LAL tests.

A. Validation of the LAL Test

Validation of the LAL test as an endotoxin test for the release of human and animal drugs includes the following: (1) initial qualification of the laboratory, and (2) inhibition and enhancement tests.

1. INITIAL QUALIFICATION OF THE LABORATORY

Various methodologies have been described for the detection of endotoxin, using limulus amoebocyte lysate. Currently, commercially available licensed lysates use the gel clot, chromogenic, endpoint-turbidimetric or kinetic-turbidimetric techniques. Other methods which have been reported show potential for increasing further the sensitivity of the LAL method.

Manufacturers should assess the variability of the testing laboratory before any official tests are performed. Each analyst using a single lot of LAL and a single lot of endotoxin should perform the test for confirmation of labeled LAL reagent sensitivity or of performance criteria. Appendix A gives the procedures and test criteria for the current licensed techniques.

2. INHIBITION AND ENHANCEMENT TESTING

The degree of product inhibition or enhancement of the LAL procedure should be determined for each drug formulation before the LAL test is used to assess the endotoxin content of any drug. All validation tests should be performed on undiluted drug product or on an appropriate dilution. Dilutions should not exceed the Maximum Valid Dilution (MVD) (see Appendix D). At least three production

batches of each finished product should be tested for inhibition and enhancement.

a) GEL-CLOT TECHNIQUE

Inhibition/enhancement testing should be conducted according to the directions in the preparatory section of the USP Bacterial Endotoxins Test (see Appendix B). Briefly, the method involves taking a drug concentration containing varying concentrations of a standard endotoxin that bracket the sensitivity of the lysate and comparing it to a series of the same endotoxin concentrations in water alone. The drug product is "spiked" with endotoxin and then diluted with additional drug product (so that the drug concentration remains constant) to the same endotoxin concentrations in water.

Results of endotoxin determination in water and the drug product should fall within plus/minus a twofold dilution of the labeled sensitivity. If the undiluted drug product shows inhibition, the drug product can be diluted, not to exceed the MVD, with the same diluent that will be used in the release testing and the above procedure repeated.

Negative controls (diluent plus lysate) should be included in all inhibition/enhancement testing.

b) CHROMOGENIC AND ENDPOINT-TURBIDIMETRIC TECHNIQUES

In inhibition/enhancement testing by these techniques, a drug concentration containing 4 lambda concentration of the RSE or CSE (lambda is equal to the lowest endotoxin concentration used to generate the standard curve) is tested in duplicate according to the lysate manufacturer's methodology. The standard curve for these techniques shall consist of at least four RSE or CSE concentrations in water that extend over the desired range. If the desired range is greater than one log, additional standards concentrations should be included. The standard curve must meet the criteria for linearity as outlined in Appendix

A(2). The detected amount of endotoxin in the spiked drug must be within plus or minus 25% of the 4 lambda concentration for the drug concentration to be considered to neither enhance nor inhibit the assay. If the undiluted drug product shows inhibition, the drug product can be diluted, not to exceed the MVD, and the test repeated.

An alternate procedure may be performed as described above except the RSE/CSE standard curve is prepared in LAL negative drug product, i.e. no detectable endotoxin, instead of LAL negative water. The standard curve must meet the test for linearity, i.e. r equal to or greater than 0.980, and in addition the difference between the O.D. readings for the lowest and highest endotoxin concentrations must be greater than 0.4 and less than 1.5 O.D. units. If the standard curve does not meet these criteria, the drug product cannot be tested by the alternate procedure.

c) KINETIC-TURBIDIMETRIC TECHNIQUE

In inhibition/enhancement testing by this technique, a drug concentration containing 4 lambda concentration of the RSE or CSE (lambda is equal to the lowest endotoxin concentration used to generate the standard curve) is tested in duplicate according to the lysate manufacturer's methodology. The standard curve shall consist of at least four RSE or CSE concentrations. If the desired range is greater than one log, additional standard concentrations should be included. The standard curve must meet the criteria outlined in Appendix A(3). The calculated mean amount of endotoxin in the spiked drug product, when referenced to the standard curve, must be within plus or minus 25% to be considered to neither enhance nor inhibit the assay. If the undiluted drug product shows inhibition or enhancement, the drug product can be diluted, not to exceed the MVD, and the test repeated.

An alternate procedure may be performed whereby the RSE/CSE standard curve is prepared in drug product or product dilution instead of water. The drug

product cannot have a background endotoxin concentration of more than $10^1 \cdot G$ (estimated by extrapolation of the regression line) of the lambda concentration (lambda equals the lowest concentration used to generate the standard curve). The standard curve must meet the test for linearity, i.e. r equal to or less than -0.980 , and in addition the slope of the regression must be less than -0.1 and greater than -1.0 . If the standard curve does not meet these criteria, the drug product cannot be tested by the alternate procedure.

In those instances when the drug is manufactured in various concentrations of active ingredient while the other components of the formulation remain constant, only the highest and lowest concentration need be tested. If there is a significant difference, i.e. greater than twofold, between the inhibition endpoints or if the drug concentration, per mL, in the test solutions is different, then each remaining concentrations should be tested. If the drug product shows inhibition or enhancement at the MVD, when tested by the procedures in the above sections, and is amenable to rabbit testing, then the rabbit test will still be the appropriate test for that drug. If the inhibiting or enhancing substances can be neutralized without affecting the sensitivity of the test or if the LAL test is more sensitive than the rabbit pyrogen test the LAL test can be used. For those drugs not amenable to rabbit pyrogen testing, the manufacturer should determine the smallest quantity of endotoxin that can be detected. This data should be submitted to the appropriate FDA Office for review.

The inhibition/enhancement tests must be repeated on one unit of the product if the lysate manufacturer is changed. If the lysate technique is changed, the inhibition and enhancement tests must be repeated using three batches. When the manufacturing process, the product formulation, the source of a particular ingredient of the drug formulation, or lysate lot is changed, the positive product control can be used to re-verify the validity of the LAL test for the product. Firms that are obtaining an ingredient from a new manufacturer are encouraged to

include as part of their vendor qualification the rabbit pyrogen test to determine that the ingredient does not contain non-endotoxin pyrogens.

B. Routine Testing of Drugs by the LAL Test.

End-product testing is to be based on data from the inhibition/enhancement testing as outlined in Section A(2). Samples, standards, positive product controls and negative controls should be tested at least in duplicate.

For the gel-clot technique, an endotoxin standard series does not have to be run with each set of tests

if consistency of standard endpoints has been demonstrated in the test laboratory. It should be run at least once a day with the first set of tests and repeated if there is any change in lysate lot, endotoxin lot or test conditions during the day. An endotoxin standard series should be run when confirming end-product contamination. Positive product controls (two lambda concentration of standard endotoxin in product) must be positive. If your test protocols state that you are using the USP Bacterial Endotoxin Test, remember that it requires a standard series to be run with each test. The above deviation must be noted in your test protocol.

For the chromogenic and endpoint-turbidimetric techniques, an endotoxin standard series does not have to be run with each set of tests if consistency of standard curves has been demonstrated in the test laboratory. It should be run at least once a day with the first set of tests and repeated if there is any change in lysate lot, endotoxin lot or test conditions during the day. However, at least duplicates of a 4 lambda standard concentration in water and in each product (positive product control) must be included with each run of samples. The mean endotoxin concentration of the standard must be within plus/minus 25% of the actual concentration and the positive product control must meet the same criteria after subtraction of any endogenous endotoxin. An endotoxin standard series should be run when confirming end-product contamination. If the alternate

procedure is used, a standard in product series must be conducted each time the product is tested.

For the kinetic-turbidimetric test, it is not necessary to run a standard curve each day or when confirming end product contamination if consistency of standard curves has been demonstrated in the test laboratory. However, at least duplicates of a 4 lambda standard concentration in water and in each product (positive product control) must be included with each run of samples. The mean endotoxin concentration of the standard when calculated using an archived standard curve (See Appendix C), must be within plus/minus 25% of the actual concentration and the positive product control must meet the same criteria after subtraction of any endogenous endotoxin. If the alternate procedure is used, a standard in product series must be conducted each time the product is tested.

Before a new lot of lysate is used, the labeled sensitivity of the lysate or the performance criteria should be confirmed by the laboratory, using the procedures in Appendix A.

The sampling technique selected and the number of units to be tested should be based on the manufacturing procedures and the batch size. A minimum of three units, representing the beginning, middle, and end, should be tested from a lot. These units can be run individually or pooled. If the units are pooled and any endotoxin is detected, repeat testing can be performed. The LAL test may be repeated no more than twice. The first repeat consists of twice the initial number of replicates of the sample in question to examine the possibility that extrinsic contamination occurred in the initial assay procedure. On pooled samples, if any endotoxin is detected in the first repeat, proceed to second repeat. The second repeat consists of an additional 10 units tested individually. None of the 10 units tested in the second repeat may contain endotoxin in excess of the limit concentration for the drug product.

The following should be considered the endotoxin limit for all parenteral drugs to meet if the LAL test is to be used as an end-product endotoxin test:

1. K/M: For any parenteral drug except those administered intrathecally, the endotoxin limit for endotoxin is defined as R/M, which equals the amount of endotoxin (EU) allowed per ng or mL of product. K is equal to 5.0 EU/Kg. (SEE appendix D for definition of M). For parenteral drugs that have an intrathecal route of administration, K is equal to 0.2 EU/Kg.

Drugs exempted from the above endotoxin limits are:

1. Compendial drugs for which other endotoxin limits have been established.
2. Non-compendial drugs covered by new drug applications, antibiotic drug applications, new animal drug applications, and biological product licenses where different limits have been approved by the agency.
3. Investigational drugs or biologicals for which an IND or INAD exemption has been filed and approved.
4. Drugs or biologicals which cannot be tested by the LAL method.

A batch which fails a validated LAL release test should not be retested by the rabbit test and released if it passes. Due to the high variability and lack of reproducibility of the rabbit test as an endotoxin assay procedure, we do not consider it an appropriate retest procedure for LAL failures.

V. MEDICAL DEVICES

General Requirements

The CDRH has reviewed the results of the "*HIMA Collaborative Study for the Pyrogenicity Evaluation of a Reference Endotoxin by the USP Rabbit Test.*" This study recommends 0.1 ng/mL (10 mL/kg) of *E. coli* 055:B5 endotoxin from Difco Laboratories as the level of endotoxin which should be detectable in the LAL test when used for end-product testing of medical devices. This sensitivity (0.1 ng/mL given 10 mL/kg) is sufficient for LAL testing and for retest of devices in rabbits. According to recent collaborative studies in the rabbit pyrogen and LAL tests, one nanogram of *E coli* 055:B5 endotoxin is similar in potency to 5 EU of the USP Endotoxin Reference Standard. The endotoxin limit for medical devices has been converted to EU and is now 0.5 EU/mL using the rinse volume recommended in Section 2 below. Liquid devices should be more appropriately validated and tested according to the requirements for drugs by taking the maximum human dose per kilogram of body weight per hour into consideration (See Section IV,B).

Manufacturers may retest LAL test failures with the LAL test or a USP rabbit pyrogen test. If the endotoxin level in a device eluate has been quantitated by LAL at 0.5 EU/mL endotoxin or greater, then retest in rabbits is not appropriate. Medical devices that contact cerebrospinal fluid should have less than 0.06 EU/mL of endotoxin. These values correspond to those set by the CDER for intrathecal drugs.

Manufacturers shall use an LAL reagent licensed by OBRR in all validation, in-process, and end-product LAL tests.

A. Validation of the *LAL* Test

1. Sensitivity: Data demonstrating the sensitivity and reproducibility of the LAL test.

2. Inhibition/Enhancement Testing: Each product line of devices utilizing different materials or methods of manufacture should be checked for inhibition or enhancement of the LAL test.

Further explanation of the above points is given as follows:

1. Sensitivity

A manufacturer must be able to demonstrate a sensitivity of at least 0.5 EU/mL. The level of endotoxin selected as the pass/fail point for evaluating pyrogenicity of products using the LAL test must be equivalent to or below this level. Manufacturers may use another endotoxin if a reproducible correlation between *it* and the USP Reference Endotoxin Standard has been demonstrated in their laboratory (see appendix C).

The sensitivity of the LAL technique used should be determined by the procedures and criteria in Appendix A. Routine performance of the LAL test should include standards (run in duplicate) and a negative control. An endotoxin standard series is useful for checking lysate sensitivity and the competence of the technician, and for identifying other problems such as the contamination of glassware.

The stability of the endotoxin standards and appropriate storage conditions should also be considered; dilute endotoxin solutions are not as stable as more concentrated solutions under certain conditions.

2. INHIBITION AND ENHANCEMENT TESTING

Lack of product inhibition or enhancement of the LAL test should be shown for each type of device before use of the LAL test. Possible inhibition of different chemical components of similar devices should be considered. A manufacturer may logically divide its device products into groups of products according to common chemical formulation; and may then qualify only a representative product from each such group. Ideally, the product chosen from each group

would be the one with the largest surface area contacting body or fluid for administration to a patient.

At least three production lots of each product type should be tested for inhibition. In general, use of the sampling technique selected should result in a random sampling of a finished production lot. CDRH recommends testing 2 devices for lot sizes under 30, 3 devices for lot sizes 30-100, and 3 percent of lots above size 100, up to a maximum of 10 devices per lot.

The process of preparing an eluate/extract for pyrogen or inhibition/enhancement testing, may vary for each device. Some medical devices can be flushed, some may have to be immersed in the non-pyrogenic rinse solution, while others may be tested by disassembling or by cutting the device into pieces prior to extraction by immersion. In general, for devices being flushed, the non-pyrogenic rinse solution should be held in the fluid pathway for one hour at room temperature (above 18° C); effluents should be combined. If a device is to undergo extraction, a minimum extraction time should be 15 minutes at 37° C, one hour at room temperature (above 18° C) or other demonstrated equivalent conditions.

Guidelines for rinse volumes include the following:

- a. Each of the 10 test units should be rinsed with 40 ml, of non-pyrogenic water.
- b. For unusually small or large devices, the surface area of the device which comes in contact with the patient may be used as an adjustment factor in selecting the rinsing or extracting volume. The endotoxin limit can be adjusted accordingly.

The rinsing scheme should not result in a greater dilution of endotoxin than used in USP rabbit pyrogen testing of transfusion and infusion assemblies. For inhibition/ enhancement testing, both the rinsing/extraction solution and the device eluate/extract should be tested as prescribed below under the specific technique being used.

a) GEL-CLOT TECHNIQUE

In inhibition/enhancement testing, a device eluate/extract containing varying concentrations of a standard endotoxin that bracket the sensitivity of the lysate is compared with a series of the same endotoxin concentrations in water alone. The device eluate/extract is "spiked" with endotoxin and then diluted with additional eluate/extract to the same endotoxin concentrations as in the water series. Results of endotoxin determination in water and the device product eluate/extract should fall within plus/minus a twofold dilution of the labeled sensitivity. If the device eluate/extract shows inhibition, the gel-clot technique cannot be used to test the device. Negative controls (diluent plus lysate) should be included in all inhibition/enhancement testing.

b) CHROMOGENIC AND ENDPOINT-TURBIDIMETRIC TECHNIQUES

In inhibition/enhancement testing by these techniques, a device eluate/extract containing 4 lambda concentration of the RSE or CSE (lambda is equal to the lowest endotoxin concentration used to generate the standard curve) is tested in duplicate according to the lysate manufacturer's methodology. The standard curve for these techniques shall consist of at least four RSE or CSE concentrations in water that extend over the desired range. If the desired range is greater than one log, additional standard concentrations should be included. The standard curve must meet the criteria for linearity as outlined in Appendix A(2). The detected amount of endotoxin in the spiked eluate/extract must be within plus or minus 25% of the 4 lambda concentration for the device to be considered to neither enhance nor inhibit the assay. If the device eluate/extract shows inhibition, the device cannot be tested by this technique. An alternate procedure may be performed as described above except the RSE/CSE standard curve is prepared in LAL negative device eluate/extract, i.e. no detectable endotoxin, instead of LAL negative water. The standard curve must meet the test for linearity, i.e. r equal to or greater than 0.980, and in addition the

difference between the O.D. readings for the lowest and highest endotoxin concentrations must be greater than 0.4 and less than 1.5 O.D. units. If the standard curve does not meet these criteria the device cannot be tested by the alternate procedure.

c) KINETIC-TURBIDIMETRIC TECHNIQUE

In inhibition/enhancement testing by this technique, a device eluate/extract containing 4 lambda concentration of the RSE or CSE (lambda is equal to the lowest endotoxin concentration used to generate the standard curve) is tested in duplicate according to the lysate manufacturer's methodology. The standard curve shall consist of at least four RSE or CSE concentrations. If the desired range is greater than one log, additional standard concentrations should be included. The standard curve must meet the criteria outlined in

Appendix A(3). The calculated mean amount of endotoxin in the spiked eluate/extract, when referenced to the standard curve, must be within plus or minus 25% to be considered to neither enhance nor inhibit the assay. If the device eluate/extract shows inhibition or enhancement, the device cannot be tested by this procedure.

An alternate procedure may be performed whereby the RSE/CSE standard curve is prepared in device eluate/extract instead of water. The eluate/extract cannot have a background endotoxin concentration of more than 10% (estimated by extrapolation of the regression line) of the lambda concentration (lambda equals the lowest concentration used to generate the standard curve). The standard curve must meet the test for linearity, i.e. r equal to or less than -0.980, and in addition the slope of the regression must be less than -0.1 and greater than -1.0. If the standard curve does not meet these criteria, the device cannot be tested by the alternate procedure.

Impurities present in different sources of raw materials may inhibit the LAL test and, therefore, inhibition testing would be necessary when the raw material source is changed.

For each group of devices, protocols and test results from endotoxin sensitivity and inhibition/enhancement studies, including the actual data from the standard series and inhibition studies should be compiled and kept on file and be available for FDA inspection.

Data should be expressed in the format most meaningful for the product (usually tabular or graphics).

B. ROUTINE TESTING OF DEVICES BY THE LAL TEST

Testing should be done using rinsing/eluting and sampling techniques as used for inhibition/enhancement testing. As in inhibition/enhancement testing, sampling can be adjusted for special situations. After a suitable eluate/extract pool is obtained from a finished production lot, this pooled extract is kept under conditions appropriate for endotoxin stability until it is tested in duplicate.

For the gel-clot technique, an endotoxin standard series does not have to be run with each set of tests if consistency of standard endpoints has been demonstrated in the test laboratory. It should be run at least once a day with the first set of tests and repeated if there is any change in lysate lot, endotoxin lot or test conditions during the day. An endotoxin standard series should be run when confirming end-product contamination. Positive product controls (two lambda concentration of standard endotoxin in product) must be positive. If your test protocols state that you are using the USP Bacterial Endotoxin Test, remember that it requires a standard series to be run with each test. The above deviation must be noted in your test protocol.

For the chromogenic and endpoint-turbidimetric techniques, an endotoxin standard series does not have to be run with each set of tests if consistency of standard curves has been demonstrated in the test laboratory. It should be run

at least once a day with the first set of tests and repeated if there is any change in lysate lot, endotoxin lot or test conditions during the day. However, at least duplicates of a 4 lambda standard concentration in water and in each product (positive product control) must be included with each run of samples. The mean endotoxin concentration of the standard must be within plus/minus 25% of the actual concentration and the positive product control must meet the same criteria after subtraction of any endogenous endotoxin. An endotoxin standard series should be run when confirming end-product contamination. If the alternate procedure is used, a standard in product series must be conducted each time the product is tested.

For the kinetic-turbidimetric test, it is not necessary to run a standard curve each day or when confirming end product contamination if consistency of standard curves has been demonstrated in the test laboratory.. However, at least duplicates of a 4 lambda standard concentration in water and in each product (positive product control) must be included with each run of samples. The mean endotoxin concentration of the standard when calculated using an archived standard curve (See Appendix C), must be within plus/minus 25% of the actual concentration and the positive product control must meet the same criteria after subtraction of any endogenous endotoxin. If the alternate procedure is used, a standard in product series must be conducted each time the product is tested.

Before a new lot of lysate is used, the labeled sensitivity of the lysate or the performance criteria should be confirmed by the laboratory, using the procedures in Appendix A.

The LAL test may be repeated no more than twice. The first repeat consists of twice the initial number of replicates of the sample in question to examine the possibility that extrinsic contamination occurred in the initial assay procedure. The second repeat consists of an additional 10 units.

For each product group, protocols and test results should be compiled and kept on file to be available for FDA inspection.

VI. APPENDICES

APPENDIX A: INITIAL QUALITY CONTROL

QUALITY CONTROL PROCEDURE

The following procedures and criteria are used for initial qualification and requalification of analysts in the laboratory, and to test new lots of lysate before use.

1) GEL CLOT ENDPOINT TECHNIQUE

For the gel-clot technique the procedures in the USP Bacterial Endotoxins Test Monograph (see Appendix B) should be used for quality control testing.

2) CHROMOGENIC AND ENDPOINT-TURBIDIMETRIC TECHNIQUES

Each test should be conducted according to the specific manufacturer's methodology. Using the RSE or CSE whose potency is known, assay 4 replicates of a set of endotoxin concentrations which extend over the labeled linear range. The standard concentrations must include the stated lower and upper limits of the range. Linear regression analysis is performed on the absorbance values of the standards (y-axis) versus their respective endotoxin concentrations (x-axis).

The coefficient of correlation, r , shall be greater than or equal to 0.980. If r is less than 0.980 the cause of the non-linearity should be determined and the test repeated. This linearity limit is also used to judge the validity of standard curves used for inhibition/enhancement tests and sample tests.

In addition to meeting these requirements, any other test or requirements specified by the lysate manufacturer should also be met.

3) KINETIC-TURBIDIMETRIC TECHNIQUE

Each test should be conducted according to the manufacturer's instructions.

Using the RSE or CSE whose potency, in endotoxin units (See Appendix C), is known, assay at least 6 concentrations in triplicate which extend over the range

0.03 - 1.0 EU/mL. If instrument configuration does not allow you to run all 6 concentrations at one time, the data can be obtained in multiple runs and combined. Perform regression-correlation analysis on the log of the Time of Reaction (T) versus the log of the endotoxin concentration (E). The coefficient of correlation, r , shall be less than or equal to -0.980. If r is greater than -0.980 the cause of the non-linearity should be determined and the test repeated. In addition to meeting these requirements, any other test or requirements specified by the lysate manufacturer should also be met.

**APPENDIX B: BACTERIAL ENDOTOXINS TEST UNITED STATES
PHARMACOPEIA XXI/NATIONAL FORMULARY XVI AND FIRST
SUPPLEMENT TO USP XXI/NF XVI**

<85> BACTERIAL ENDOTOXINS TEST

This chapter provides a test for estimating the concentration of bacterial endotoxins that may be present in or on the sample of the article(s) to which the test is applied using Limulus Amebocyte Lysate (LAL) which has been obtained from aqueous extracts of the circulating amebocytes of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, and which has been prepared and characterized for use as a LA reagent for gel-clot formation.

Where the test is conducted as a limit test, the specimen is determined to be positive or negative to the test judged against the endotoxin concentration specified in the individual monograph. Where the test is conducted as an assay of the concentration of endotoxin, with calculation of confidence limits of the result obtained, the specimen is judged to comply with the requirements if the result does not exceed (a) the concentration limit specified in the individual monograph, and (b) the specified confidence limits for the assay. In either case the determination of the reaction end-point is made with dilutions from the material under test in direct comparison with parallel dilutions of a reference endotoxin and quantities of endotoxin are expressed in defined Endotoxin Units. Since LAL reagents have also been formulated to be used for turbidimetric (including kinetic assays) or colorimetric readings, such tests may be used if shown to comply with the requirements for alternative methods.

These tests require the establishment of a standard regression curve and the endotoxin content of the test material is determined by interpolation from the curve. The procedures include incubation for a pre-selected time of reacting endotoxin and control solutions with LAL Reagent and reading of the spectrophotometric light absorbance at suitable wavelengths. In the case of the

turbidimetric procedure the reading is made immediately at the end of the incubation period or in the kinetic assays the absorbance is measured throughout the reaction period and rate values are determined from those readings. In the colorimetric procedure the reaction is arrested at the end of the pre-selected time by the addition of an appropriate amount of acetic acid solution prior to the readings. A possible advantage in the mathematical treatment of results if the test be otherwise validated and the assay suitably designed, could be the application of tests of assay validity and the calculation of the confidence interval and limits of potency from the internal evidence of each assay itself (see Design and Analysis of Biological Assays <111>).

Reference Standard and Control Standard Endotoxins

The reference standard endotoxin (RSE) is the USP Endotoxin Reference Standard which has a defined potency to 10,000 USP Endotoxin Units (EU) per vial. Constitute the entire contents of 1 vial of the RSE with 5 mL of LAL Reagent Water.¹

- Vortex for not less than 20 minutes
- And use this concentrate for making appropriate serial dilutions. Preserve the concentrate in a refrigerator, for making subsequent dilutions for not more than 14 days
- Allow it to reach room temperature, If applicable, and vortex it vigorously for not less than 5 minutes before use. Vortex each dilution for not less than 1 minute before proceeding to make the next dilution
- Do not use stored dilutions. A control standard endotoxin (CSE) is an endotoxin preparation other than the RSE that has been standardized against the RSE. If a CSE is a preparation not already adequately characterized its evaluation should include characterizing parameters both for endotoxin quality and performance (such as reaction in the rabbit), and for suitability of the material to serve as reference (such as uniformity and stability).

- Detailed procedures for its weighing and/or constitution and use to assure consistency in performance should also be included
- Standardization of a CSE against the RSE using a LAL Reagent for the gel-clot procedure may be effected by assaying a minimum of 4 vials of the CSE or 4 corresponding aliquots, where applicable, of the bulk CSE and 1 vial of the RSE, as directed under *Test Procedure*, but using 4 replicate reaction tubes at each level of the dilution series for the RSE and 4 replicate reaction tubes similarly for each vial of aliquot of the CSE. If all of the dilutions for the 4 vials or aliquots of the CSE cannot be accommodated with the dilutions for the 11 vial of the RSE on the same rack for incubation, additional racks may be used for accommodating some of the replicate dilutions for the CSE, but all of the racks containing the dilutions of the RSE and the CSE are incubated as a block. However, in such cases, the replicate dilution series from the 1 vial of the RSE are accommodated together on a single rack and the replicate dilution series from any one of the 4 vials or aliquots of the CSE are not divided between racks.
- The antilog of the difference between the mean \log_{10} end-point of the RSE and the mean \log_{10} end-point of the CSE is the standardized potency of the CSE which then is to be
- Converted to and expressed in Units per ng under stated drying conditions for the CSE, or in Units per container, whichever is appropriate. Standardize each new lot of CSE prior to use in the test. Calibration of a CSE in terms of the RSE must be with the specific lot of LAL Reagent and the test procedure with which it is to be used. Subsequent lots of LAL Reagent from the same source and with similar characteristics need only checking of the potency ration.
- The inclusion of one or more dilution series made from the RSE when the CSE is used for testing will enable observation of whether or not the relative potency shown by the latter remains within the determined confidence limits
- A large lot of a CSE may, however, be characterized by a collaborative assay of a suitable design to provide a representative relative potency and the within-

laboratory and between-laboratory variance. A suitable CSE has a potency of not less than 2 Endotoxin Units per ng and not more than 50 Endotoxin Units per ng, where in bulk form, under adopted uniform drying conditions, e.g., to a particular low moisture content and other specified conditions of use, and a potency within a corresponding range where filled in vials of a homogeneous lot.

Preparatory Testing

Use a LAL reagent of confirmed label or determine sensitivity. In addition, where there is to be a change in lot of CSE, LAL Reagent or another reagent, conduct tests of a prior satisfactory lot of CSE, LAL and/or other reagent in parallel on changeover. Treat any containers or utensils employed so as to destroy extraneous surface endotoxins that may be present, such as by heating in an oven at 250° or above for sufficient time.² The validity of test results for bacterial endotoxins requires an adequate demonstration that specimens of the article, or of solution, washings, or extracts thereof to which the test is to be applied do not of themselves inhibit or enhance the reaction or otherwise interfere with the test. Validation is accomplished by testing untreated specimens or appropriate dilutions thereof, concomitantly with and without known and demonstrable added amounts of RSE or a CSE and comparing the results obtained. Appropriate negative controls are included.

Validation must be repeated if the LAL Reagent source or the method of manufacture or formulation of the article is changed.

Test for confirmation of labeled LAL Reagent sensitivity –

- Confirm the labeled sensitivity of the particular LAL reagent with the RSE (or CSE) using not less than 4 replicate vials, under conditions shown to achieve an acceptable variability of the test, viz, the antilog of the geometric mean \log_{10} lysate gel-slot sensitivity is within 0.5λ to 2.0λ , where λ is the labeled sensitivity in Endotoxin Units per mL. The RSE (or CSE) concentration selected in

confirming the LAL reagent label potency should bracket the stated sensitivity of the LAL reagent. Confirm the labeled sensitivity of each new lot of LAL reagent prior to use in the test.

Inhibition of Enhancement Test – Conduct assays with standard endotoxin or untreated specimens in which there is no endogenous endotoxin detectable, and of the same specimens to which endotoxin has been added as directed under *Test Procedure*, but using not less than 4 replicate reaction tubes at each level of the dilution series for each untreated specimen and for each specimen to which endotoxin has been added. Record the endpoints (E, in Units per mL) observed in the replicates. Take the logarithms (e) of the end-points and compute the geometric means of the log end-points for the RSE (or CSE), for the untreated specimens and for specimens containing endotoxin by the formula $\text{antilog } \Sigma e/f$, in which Σe is the sum of the log end-point of the dilution series used and f is the number of replicate end-points in each case. Compute the amount of endotoxin in the specimen to which endotoxin has been added. The test is valid for the article if this result is within twofold of the known added amount of endotoxin. Alternatively, if the test has been appropriately set up, the test is valid for the article if the geometric mean end-point dilution for the specimen to which endotoxin has been added is within one 2-fold dilution of the corresponding geometric mean end-point dilution of the standard endotoxin.

If the result obtained for the specimens to which endotoxin has been added is outside the specified limit, the article is unsuitable for the *Bacterial Endotoxins Test*, or, in the case of Injections or solutions for parenteral administration, it may be rendered suitable by diluting specimens appropriately.

Repeat the test for inhibition or enhancement using specimens diluted by a factor not exceeding that given by the formula x/λ (see *Maximum Valid Dilution*, below). Use the least dilution sufficient to overcome the inhibition or enhancement of the known added endotoxin for subsequent assays of

endotoxin in test specimens. If endogeneous endotoxin is detectable in the untreated specimens under the conditions of the test, the article is unsuitable for the *Inhibition or Enhancement Test*, or, it may be rendered suitable by removing the endotoxin present by ultra-filtration, or by appropriate dilution. Dilute the untreated specimen (as constituted, where applicable, for administration or use), to a level not exceeding the maximum valid dilution, at which no endotoxin is detectable. Repeat the test for *Inhibition or Enhancement* using the specimens at those dilutions.

Test Procedure

In preparing for and applying the test, observe precautions in handling the specimens in order to avoid gross microbial contamination. Washings or rinsings of devices must be with LAL Reagent Water in volumes appropriate to their use and, where applicable, of the surface area which comes into contact with body tissues or fluids. Use such washings or rinsings if the extracting fluid has been in contact with the relevant pathway or surface for not less than 1 hour at controlled room temperature (15° to 30°) such extracts may be combined, where appropriate. The ultimate rinse or wash volume is such as to result in possible dilution of any contained endotoxin to a level not less than that suitable for use in the *Pyrogen Test* <151> under *Transfusion and Infusion Assemblies* <161>.

For validating the test for an article, for endotoxin limit tests or assays, or for special purposes where so specified, testing of specimens is conducted quantitatively to determine response end-points for gel-clot readings.

Usually graded strengths of the specimen and standard endotoxin are made by multifold dilutions.

- Select dilutions so that they correspond to a geometric series in which each step is greater than the next lower by a constant ratio

- Do not store dilute endotoxin, because of loss of activity by adsorption. In the absence of supporting data to the contrary, negative and positive controls are incorporated in the test.

Use not less than 2 replicate reaction tubes at each level of the dilution series for each specimen under test.

Whether the test is employed as a limit test or as a quantitative assay, a standard endotoxin dilution series involving not less than 2 replicate reaction tubes is conducted in parallel. A set of standard endotoxin dilution series is included for each block of tubes, which may consist of a number of tracks for incubation together, provided the environmental conditions within blocks are uniform.

Preparation – Since the form and amount per container of standard endotoxin and of LAL reagent may vary, constitution and/or dilution of contents should be as directed in the labeling. The pH of the test mixture of the specimen and the LAL Reagent is in the range 6.0 to 7.5 unless specifically directed otherwise in the individual monograph. The pH may be adjusted by the addition of sterile endotoxin-free sodium hydroxide or hydrochloric acid or suitable buffers to the specimen prior to testing.

Maximum Valid Dilution (MVD) – The Maximum Valid Dilution is appropriate to Injections or to solutions for parenteral administration in the form constituted or diluted for administration or where applicable to the amount of drug by weight if the volume of the dosage form for administration could be varied. Where the endotoxin limit concentration is specified in the individual monograph in terms of volume (in EU per mL), divide the limit by λ , which is the labeled sensitivity (in EU per mL) of the lysate employed in the assay, to obtain the MVD factor. Where the endotoxin limit concentration is specified in the individual monograph in terms of weight or of Units of active drug (in EU per mg or in EU per Unit), multiply the limit by the concentration (in mg per mL or in Units per mL) of the

drug in the solution tested or of the drug constituted according to the label instructions, whichever is applicable, and divide the product of the multiplication by λ , to obtain the MVD factor. The MVD factor so obtained is the limit dilution factor for the preparation for the test to be valid.

Procedure – To 10 x 75 mm test tubes add aliquots of the appropriate constituted LAL Reagent, and the specified volumes of specimens, endotoxin standard, negative controls, and a positive product control consisting of the article, or of solutions, washings or extracts thereof to which the RSE (or a standardized CSE) has been added at a concentration of endotoxin of 2λ for that LAL reagent (see under *Test for confirmation of labeled LAL Reagent sensitivity*). Swirl each gently to mix, and place in an incubating device such as a water bath or heating clock, accurately recording the time at which the tubes are so placed. Incubate each tube undisturbed, for 60 ± 2 minutes at $31 \pm 1^\circ$, and carefully remove it for observation. A positive reaction is characterized by the formation of a firm gel that remains when inverted through 180° . Record such a result as positive (+). A negative result is characterized by the absence of such a gel or by the formation of a viscous gel that does not maintain its integrity. Record such a result as negative (-). Handle the tubes with care, and avoid subjecting them to unwanted vibrations, or false negative observations may result. The test is invalid if the positive product control or ht endotoxin standard does not show the end-point concentration to be within ± 1 twofold dilutions from the label claim sensitivity of the LAL Reagent or if any negative control shows a gel-clot endpoint.

Calculation and Interpretation

Calculation – Calculate the concentration of endotoxin (in Units per mL or in Units per g or mg) in or on the article under test by the formula pS/U , in which S is the antilog of the geometric mean \log_{10} of the end-points,

expressed in Endotoxin Units (EU) per mL for the Standard Endotoxin, U is the antilog of $\Sigma e/f$, where e is the \log_{10} of the end-point dilution factors, expressed in decimal fractions, f , is the number of replicate reaction tubes read at the end-point level for the specimen under test, and p is the correction factor for those cases where a specimen of the article cannot be taken directly into test but is processed as an extract, solution, or washing.

Where the test is conducted as an assay with sufficient replication to provide a suitable number of independent results, calculate for each replicate assay the concentration of endotoxin in or on the article under test from the antilog of the geometric mean log end-point ratios. Calculate the mean and the confidence limits from the replicate logarithmic values of all the obtained assay results by a suitable statistical method (see *Calculation of Potency from a Single Assay <111>*).

Interpretation – The article meets the requirements of the test if the concentration of endotoxin does not exceed that specified in the individual monograph, and where so specified in the individual monograph or in this chapter, the confidence limits of the assay do not exceed those specified.

**APPENDIX C: DETERMINATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE
CONTROL STANDARD ENDOTOXIN (CSE) AND THE REFERENCE
STANDARD ENDOTOXIN (RSE)**

If a manufacturer chooses to use an endotoxin preparation (CSE) other than the United States Pharmacopeia Reference Standard Endotoxin (RSE), the CSE will have to be standardized against the RSE. If the CSE is not a commercial preparation which has been adequately characterized, it should be studied and fully characterized as to uniformity, stability or the preparation, etc. The relationship of the CSE to the RSE should be determined prior to use of a new lot, sensitivity, or manufacturer of the LAL or a new lot source or manufacturer of the CSE.

A. GEL-CLOT TECHNIQUE

The following is an example of a procedure to determine the relationship of the CSE to the RSE:

At least 4 samples (vials) for the lot of CSE should be assayed. State in ng/mL the endpoint for the CSE and in EU/mL of the RSE. The values obtained should be the geometric mean of the endpoints using a minimum of 4 replicates.

Example: LAL endpoints for the RSE and CSE are as follows:

RSE = 0.3 EU/mL

CSE = 0.018 ng/mL

The EUs per ng of CSE are calculated as follows:

RSE = 0.3 EU/mL = 16.7 EU/ng

CSE 0.018 ng/mL

This indicates that 0.018 ng of the CSE is equal to 0.3 EU of the RSE. Thus, the CSE contains 16.7 EU/ng.

B. CHROMOGENIC AND ENDPOINT-TURBIDIMETRIC TECHNIQUES

At least 4 samples (vials) for the lot of CSE should be assayed. In addition to a water blank, assay dilutions of RSE which fall in the linear range and dilutions of the CSE. Linear regression analysis is performed on the absorbance values of the RSE standards (y-axis) versus their respective endotoxin concentrations (x-axis). Calculate the EU/ng of the CSE by inserting the average CSE O.D. readings for each concentration which falls in the RSE standard range into the SE straight line equation. The resulting CSE values (in EU) are then divided by their corresponding concentrations (in ng/mL). These values are then averaged to obtain the potency of the CSE lot.

EXAMPLE:

RSE Standard Curve

	Concentration	O.D.
RSE (EU/mL)	0.1	0.11
	0.25	0.26
	0.5	0.49
	1.0	1.06

y-intercept = -0.008 slope = 1.056 r = 0.999

Straight Line Equation (Y) = -0.008 + (1.056 * X)

CSE Standard Curve Conc. (ng/mL)	CSE AVERAGE O.D.	Corresponding RSE (EU/mL)	EU/ng (RSE/CSE)
0.01	0.12	0.119	11.9
0.025	0.31	0.301	12.0
0.05	0.60	0.626	12.5
0.1	1.23	1.291	12.9

Mean EU/ng = 12.3

C. KINETIC-TURBIDIMETRIC TECHNIQUE

In order to assign EUs to a CSE, the following should be performed on 4 vials from the same CSE lot. Twofold dilutions of the RSE should be made in the range of 1.0 EU/mL to 0.03 EU/mL. Determine the Time of Reaction (T) for at least duplicates of each standard concentration. Construct a standard curve (Log₁₀ T versus Log₁₀ endotoxin concentration (E)). Calculate the mean T for 1.0 and 0.03 EU/mL. These T's define the RSE standard range. For each of the four vials of CSE make twofold dilutions such that the T values for at least 3 concentrations of the CSE are within the RSE standard range. Determine the T values for at least duplicates of each endotoxin concentration. Calculate the EU/ng of CSE by inserting the log mean CSE T values for each endotoxin concentration which falls in the RSE standard range into the RSE straight line equation. The resulting CSE values (in EU) are then divided by their corresponding concentrations (in ng/mL). These values are averaged to obtain the potency of the CSE lot.

EXAMPLE:

RSE Standard Curve

Straight Line Equation (Y) = 3.03 + (-0.181 * X)

RSE Standard Range = 1037 - 2235 seconds (17.3-37.3 minutes)

CSE Standard Curve

Endotoxin Concentration(ng/mL)

Vial	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.006	0.003
1	1018.8	1114	1218.6	1402.7	1548.7	1740.7
2	990.7	1090.6	1249.8	1406.4	1586.0	1780.0
3	998.2	1116.8	1227.8	1411.0	1554.1	1800.9
4	1003.4	1086.1	1198.5	1415.6	1593.9	1781.0

Note: Each T in the above table is expressed in seconds and represents the mean of at least duplicate determinations.

Mean T (sec.)	1002.8*	1101.9	1223.7	1408.9	1570.7	1775.7
Log mean T	3.001	3.042	3.088	3.149	3.196	3.249

Calculations:

Solving for EU/mL equivalent by substituting onset times generated with CSE (ng/mL) into the above RSE standard line equation, $X = (Y - 3.03) / -0.181$ where $Y = \log$ mean onset time and $X = \log$ EU/ml equivalent.

EU/mL Equivalent				
CSE Endo. Cone. (ng/mL)	Log Mean T	(RSE Std. Line) Log	Antilog	EU/ng
0.1*	3.001	0.16	1.45	14.5
0.05	3.042	-0.066	0.859	17.2
0.025	3.088	-0.32	0.479	19.2
0.0125	3.149	-0.657	0.22	17.6
0.006	3.196	-0.917	0.121	20.2
0.003	3.249	-1.210	0.062	20.6

Mean EU/ng = 19.0 (SD = 1.52)

* Outside the RSE standard range - not used in calculation of mean.

The values for the y-intercept and slope of the four CSE curves used for the EU/ng determination may be stored for use in routine testing (archived standard curve) instead of running a series of standards each day. Using the EU/ng conversion factor, CSE standards within the range of the RSE curve can be made up in endotoxin units.

Standards outside this range require the use, of RSE and a new RSE standard curve. If CSE standards outside the RSE standard range are required the EU/ng conversion factor must be determined for the new range as described above.

APPENDIX D

MAXIMUM VALID DILUTION

To determine how much the product can be diluted and still be able to detect the limit endotoxin concentration, the following two methods will determine the Maximum Valid Dilution:

METHOD I

This method is used when there is an official USP limit or when the limits listed in Appendix E are used.

$$\text{MVD} = \text{Endotoxin Limit} \times \text{Potency of Product}$$

For drugs administered on a weight-per-kilogram basis, the potency is expressed as mg or units/mL and for drugs administered on a volume-per-kilogram basis, the potency is equal to 1.0 mL/mL.

METHOD II

This method is used when there is no official USP limit and the limits listed in Appendix E are not used.

Step 1. Minimum Valid Concentration (MVC)

$$\text{MVC} = \frac{\lambda M}{K}$$

Where:

λ = GEL CLOT: Labeled sensitivity-EU/mL. CHROMOGENIC, TURBIDIMETRIC and KINETIC-TURBIDIMETRIC:

The lowest point used in the standard curve.

M = Rabbit Dose or Maximum Human Dose/Kg of body weight that would be administered in a single one hour period, whichever is larger. For radiopharmaceuticals, M equals the rabbit dose or maximum human dose/Kg at the product expiration date or time. Use 70 Kg as the weight of the average human when calculating the maximum human dose per Kg. Also, if the pediatric dose/Kg is higher than the adult dose then it shall be the dose used in the formula.

K = 5.0 EU/Kg for parenteral drugs except those administered intrathecally; 0.2 EU/Kg for intrathecal drugs

Step 2. Maximum Valid Dilution (MVD)

$$\text{MVD} = \frac{\text{Potency of Product}}{\text{MVC}}$$

For drugs administered on a weight-per-kilogram basis, the potency is expressed as mg or units/mL and for drugs administered on a volume-per-kilogram, the potency is equal to 1.0 mL/mL.

METHOD I EXAMPLES

Endotoxin Limit Expressed by Weight

Product: Cyclophosphamide Injection

Potency: 20 mg/mL

Lysate Sensitivity (λ) : 0.065 EU/mL

Endotoxin Limit (Appendix E): 0.17 EU/mg

$$\text{MVD} = \frac{0.17 \text{ EU/mR} \times 20 \text{ mR/ml}}{0.065 \text{ EU/mL}} = \underline{3.4} = 1:52.3 \text{ or } 1:52$$

Endotoxin Limit Expressed by Volume:

Product: 5% Dextrose Injection

Lysate Sensitivity (X): 0.065 EU/mL

Endotoxin Limit (Appendix E): 0.5 EU/mL

$$\text{MVD} = \frac{0.5 \text{ EU/mL} \times 1 \text{ mL/mL}}{0.065 \text{ EU/mL}} = \frac{0.5}{0.065} = 1:7.7$$

METHOD II EXAMPLES

PARENTERAL DRUGS EXCEPT INTRATHECAL

Drug Administered on a Weight-per-Kilogram Basis

Product: Cyclophosphamide Injection

Potency: 20 mg/mL

Maximum Dose/Kg (M): 30 mg/Kg

Lysate Sensitivity (λ): 0.065 EU/mL

$$\text{MVC} = \frac{\lambda M}{K} = \frac{0.065 \text{ EU/mL} \times 30 \text{ mg/Kg}}{5.0 \text{ EU/Kg}} = 0.390 \text{ mg/mL}$$

$$\text{MVD} = \frac{\text{Potency of Product}}{\text{MVC}} = \frac{20 \text{ mg/mL}}{0.390 \text{ mg/mL}} = 1:51.2 \text{ or } 1:51$$

Drug Administered on a Volume-per-Kilogram Basis

Product: 5% Dextrose in Water

Maximum Dose/Kg (M): 10.0 mL/Kg

Lysate Sensitivity (λ): 0.065 EU/mL

$$\text{MVC} = \frac{\lambda M}{K} = \frac{0.065 \text{ EU/mL} \times 10.0 \text{ mL/Kg}}{5.0 \text{ EU/Kg}} = 0.13 \text{ mL/mL}$$

$$\text{MVD} = \frac{\text{Potency of Product}}{\text{MVC}} = \frac{1.0 \text{ mL/mL}}{0.13 \text{ mL/mL}} = 1:7.7$$

INTRATHECAL DRUGS

Drug Administered on a Weight-per-Kilogram Basis

Product: Gentamicin Sulfate

Potency: 2.0 mg/mL

Maximum Dose/Kg (M): 0.11 mg/Kg

Lysate Sensitivity (A): 0.1 EU/mL

$$\text{MVC} = \frac{\lambda M}{K} = \frac{0.1 \text{ EU/mL} \times 0.11 \text{ mg/Kg}}{0.2 \text{ EU/Kg}} = 0.055 \text{ mg/mL}$$

$$\text{MVD} = \frac{\text{Potency of Product}}{\text{MVC}} = \frac{2.0 \text{ mg/mL}}{0.055 \text{ mg/mL}} = 1:36.4$$

Drug Administered on a Volume-per-Kilogram Basis

Product: Lidocaine Hydrochloride Injection

Maximum Dose/Kg (M): 0.057 mL/Kg

Lysate Sensitivity (λ) 0.1 EU/mL

$$\text{MVC} = \frac{\lambda M}{K} = \frac{0.1 \text{ EU/mL} \times 0.057 \text{ mL/Kg}}{0.2 \text{ EU/Kg}} = 0.0285 \text{ mL/mL}$$

$$\text{MVD} = \frac{\text{Potency of Product}}{\text{C}} = \frac{1.0 \text{ mL/mL}}{0.0285 \text{ mL/mL}} = 1:35.0$$

APPENDIX E
December, 1987

MAXIMUM DOSE AND ENDOTOXIN LIMIT TABLE

<u>Drug Name</u>	<u>Dose (M)</u> (R)= Rabbit Dose	<u>Endotoxin Limit</u> (EU/mg,ml,units of product)
-A-		
Acetazolamide Sodium	10.0 mg	0.50
Acetylcysteine Injection	150 mg	0.03
Acyclovir Sodium	30 mg	0.17
Adenosine Phosphate	0.71 mg	7.04
Albumin, Normal Human Serum (25X)	3.0 ml(R)	1.67
Albumin, Normal Human Serum (20X)	3.75 ml(R)	1.33
Albumin, Normal Human Serum (5X)	10.0 ml(R)	0.50
Alcohol and Dextrose Injection	10.0 ml(R)	0.50
Alfentanil Hydrochloride	250 mcg	0.02
Alkaloids of Belladonna	0.007 mg	714.29
Alphaprodine HU Injection	1 mg(R)	5.00
Alprostadil (Prostaglandin)	100 mcg	0.05 +
Amdinocillin	10 mg	0.50
Amikacin Sulfate Injection	25 mg(R)	0.20
Amino Acid Injection	25 mg	0.20
Amino Acids and Electrolytes	25 mg	0.20
Essential Amino Acids and Dextrose	25 mg	0.20
Aminocaproic Acid Injection	250 mg(R)	0.02
Aminohippurate Sodium Injection	125.0 mg	0.04
Aminophylline Injection	5.0 mg	1.00
Amitriptyline HCl Injection	0.42 mg	12.0
Ammonium Chloride Injection	50 mg(R)	0.10
Amobarbital sodium	14.3 mg	0.35
Amoxicillin	20.0 mg	0.25
Amphotericin B for Injection	2.0 mg(R)	2.50
*Amphotericin B for Injection	0.007 mg	28.57
Ampicillin Sodium	20.0 mg(R)	0.25
Amrinone Lactate	1.50 mg	3.35
Anileridine	0.7 mg	7.20
Anticoagulant Heparin Solution	2.0 ml(R)	2.50
Antihemophilic Factor	10 units(R)	0.50
Antihemophilic Plasma(1 hr. at 56-57°C)	3.0 ml(R)	1.67
Antirabies Serum	3.0 ml(R)	1.67
Antitoxin (Gas Gangrene)	3.0 ml(R)	1.67
Antivenom	3.0 ml(R)	1.67
Apomorphine HCl Tablets for Injection	0.09 mg	55.56
Arginine HU Injection	500 mg	0.01
Ascorbic Acid	25 mg	0.2

Asparaginase for Injection	200 IU	2.9
Atracurium Besylate	0.6 mg	8.35
Atropine Sulfate	0.029 mg	172.0
Aurothioglucose Suspension	0.7 mg	7.14
Azathioprine Sodium for Injection	5.0 mg	1.00
Azlocillin	75.0 mg	0.07
Aztreonam for Injection	50.0 mg(R)	0.10

-B-

Bacitracin	500 units	0.01
Bacitracin Zinc	500 units	0.01
Benzquinamide HU	1.0 mg	5.0
Benztropine Mesylate Injection	0.086 mg	58.00
Benzylpenicilloyl Polylysine	0.03 ml(R)	167.00
Betamethasone Acetate and Betametasone Sodium Phosphate Injection	0.17 mg	29.2
Betamethasone Sodium <i>Phosphate Injection</i>	0.17 mg	29.2
Betazole HCl Injection	2.86 mg	1.75
Bethanechol Chloride	0.2 mg	25.00
Biperiden Lactate Injection	0.06 mg	83.30
Bleomycin Sulfate	0.5 unit(R)	10.00
Bretylum Tosylate Injection	25.0 mg	0.20
Bretylum Tosylate in Dextrose	25.0 mg	0.20
Brompheniramine Maleate Injection	0.29 mg	17.00
Bumetanide	0.25 mg(R)	20.00
Bupivacaine Hydrochloride Injection	2.5 mg	2.5
Bupivacaine Hydrochloride and Epinephrine Injection	0.26 mg	19.2
Bupivacaine HU and Dextrose	0.71 mg	7.0
Buprenorphine HU	0.009 mg	556.0
Butorphanol Tartrate	0.057 mg	88.0

-C-

Caffeine	8.0 mg	0.63
Caffeine and Sodium Benzoate	8.0 mg	0.63
Calcitonin - Salmon	4 USP unit	1.25
Calcium Ascorbate	14.3 mg	0.35
Calcium Chloride	25 mg	0.20
Calcium Disodium Edetate	35.0 mg	0.143
Calcium Gluceptate Injection	25.7 mg Ca	0.2
Calcium Gluconate	300 mg(R)	0.02
Calcium Levulinate	200 mg(R)	0.03
Capreomycin Sulfate	20.0 mg	0.25
Carbazochrome Salicylate	0.14 mg	34.96
Carbenicillin Disodium	200 mg(R)	0.025
Carboprost Tromethamine	10.0 mcg(R)	0.5
Carmustine for Injection	5.3 mg	0.95

Cefamandole Nafate	50 mg(R)	0.10
Cefazolin Sodium	50 mg(R)	0.10
Cefonicid Sodium	14.3 mg	0.35
Cefoperazone Sodium	28.57 mg	0.2
Ceforanide	14.3 mg	0.35
Cefotaxime Sodium	28.5 mg	0.20
Cefotetan Disodium	50.0 mg(R)	0.10
Cefoxitin Sodium	50 mg(R)	0.10
Ceftazidime	50 mg(R)	0.10
Ceftizozime Sodium	50 mg(R)	0.10
Ceftriaxone Sodium	28.6 mg	0.20
Cefurozime Sodium	21.4 mg	0.23
Cephacetrile Sodium for Infection	80 mg(R)	0.06
Cephaloridine	50 mg(R)	0.10
Cephalothin Sodium Injection	50 mg(R)	0.10
Cephapirin Sodium	100 mg(R)	0.06
Cephradine for Infection	80 mg(R)	0.06
Cerulitide diethylamine	0.3 mcg	16.67
Chloramphenicol Sodium Succinate	25 mg	0.2
Chlordiazepoxide HCl	- 4 mg(R)	1.25
Chloroprocaine HCl	11.43 mg	0.45
Cholecystokinin	1.0 IDU	5.0
Chorionic Gonadotropin	1000 uaits(R)	0.005
Chlormerodrin Hg197 Injection	7 ml	25.00 +
Chlormerodrin Hg203 Infection	7 ml	25.00 +
Chlormerodrine	1.4 mg	3.57
Chloroquine HCl Injection	7.5 mg	0.70
Chlorothiazide Sodium	15 mg	0.30
Chlorpheniramine Maleate	0.57 mg	8.80
Chlorpromazine HCl	0.72 mg	6.90
Chlorprothixene Infection	0.72 mg	6.90
Chlortetracycline HCl	5 mg	1.00
Chormate Sodium Cr51 Injection	7 ml	25.00 +
Chromic Chloride Injection	1.0 ug(R)	5.00
Chromic Phosphate P32 Suspension	7 ml	25.00 +
Chymopapain	57.14 units	0.09
Chymotrypain	4.3 units	1.16
Cimetidine HCl Injection	10.0 mg	0.5
Cisplatin for Injection	2.7 mg	1.90
Citrate,Phosphate,Dextrose,Adenine Sol.	0.9 ml	5.56
Cliadamycin Phosphate Infection	24 mg(R)	0.20
Cloxacillin	20.0 mg(R)	0.25
Codeine Phosphate Infection	0.86 mg	5.80
Colchicine Infection	0.04 mg	125.00
Colistimethate Sodium	10 mg(R)	0.50
Conjugated Estrogens	0.36 mg	13.89
Corticotropin, Gel, Zinc & Repository	1.1 units	4.60
Cortisone Acetate	5.0 mg	1.00
Cosyatropin	3.57 mcg	1.40

Cryptenamine Acetate	1.86 CSR units	2.69
Cupric Chloride Injection	0.2 mg(R)	25.00
Cupric Sulfate Injection	0.2 mg(R)	25.00
Cyanocobalamine and Repository	14.3 mcg	0.35
Cyclizine Lactate	1.00 mg	5.00
Cyclophosphamide	30.0 mg	0.20
Cyclosporine Injection and Concentrate	0.12 mL	42.00 +
Cysteine HCl	7.14 mg	0.70
*Cytarabine	3.00 mg	0.07

-D-

Dacarbazine for Injection		5.00 mg(R)	1.00
Dactinomycin for Injection		0.2 mg(R)	25.0
Dantrolene Sodium		10 mg	0.50
Daunorubicin HU		2.25 mg(R)	2.20
Decamethonium Bromide		0.043 mg	116.3
Deferoxamine Mesylate		30 mg(R)	0.17
Dehydrocholate Sodium Injection		150 mg	0.04
Deslanoside		0.03 mg	167.0
Desmopressin Acetate		0.5 Meg	10.00
Desoxycorticosterone Acetate Injection		0.07 mg	71.40
Desoxycorticosterone Pivalate Suspension		1.8 mg	2*78
Dexamethasone Acetate Suspension		0.23 mg	21.74
Dexamethasone Sodium Phosphate Injection		0.16 mg	31.30
Dexpanthenol		7.1 mg	0.70
Dextran 40		5.0 ml	1.00
Dextran 40 in Sodium Chloride		5.0 ml	1.00
Dextran 70		10.0 ml	0.50
Dextrose- 5%-70%		10.0 ml(R)	0.50
Dextrose and Sodium Chloride		10.0 ml(R)	0.50
Diatrizoate Meglumine Injection		60% 1.0 ml	5.0
		30% 4.4 ml	1.10
Diatrizoate Meglumine and Diatrizoate Sodium	66% - 10%	2.3 ml	2.17
	60% - 30%	1.4 ml	3.57
	52% - 8%	2.8 ml	1.80
	50%	- 25%	2.8 ml 1.80
	34.3%	- 35%	2.8 ml 1.80
	28.5% - 29.1%	2.8 ml	1.80
Diatrizoate Sodium	50%	1 ml	5.0
	25%	4 ml	1.25
	20%	0.9 ml	5.56
Diazepam Injection		0.43 mg	11.60
Diazoxide Injection		10.0 mg	0.50
*Dibucaine		0.14 mg	35.70
Dibucaine HU and Dextrose		0.07 mg	71.43
Dicloxacillin Sodium		20 mg(R)	0.25
Dicyclomine HCl Injection		0.29 mg	17.20

Diethylstilbestrol Injection	7.14 mg	0.70
Diethylstilbestrol Diphosphate	7.14 mg	0.70
Digitoxin Injection	0.045 mg	111.00
Digoxin Injection	0.025 mg	200.0
Dihydroergotamine Mesylate	0.014 mg	357.00
Dihydroergotamine Mesylate, Heparin Sodium & Lidocaine HCl	1667 units	0.003 (Heparin)
Dihydrostreptomycin Sulfate	10.0 mg(R)	0.50
Dihydrotachysterol	0.03 mg	166.67
Diluent for Meningococcal Vaccine	5.0 ml(R)	1.00
Dimenhydrinate Injection	1.25 mg	4.00
Dimercaprol	5.0 mg	1.00
Dinoprost Tromethamine	0.57 mg	8.77
Diphenhydramine HCl Injection	1.5 mg	3.35
Diphenidol	0.3 mg	16.67
Diphtheria Antitoxin, Pur. Conc. (equine)	3.0 ml(R)	1.67
Dobutamine HCl	5.0 mg(R)	1.00
Dopamine HU	3.0 mg	1.70
Dopamine HU in Dextrose	3.0 mg	1.70
Doxapram HCl Injection	4.00 mg	1.25
Doxorubicin HCl for Injection	2.25 mg(R)	2.20
Doxycycline Hyclate for Injection	7.5 mg(R)	0.67
Dromostanolone Propionate	1.4 mg	3.57
Droperidol	0.14 mg	35.70
Dyphylline Injection	7.1 mg	0.70

-E-

Edetate Calcium Disodium	400 mg(R)	0.01
Edetate Disodium	250 mg(R)	0.02
Edrophonium Chloride Injection	1 mg(R)	5.00
Electrolyte Solutions- LVP	10 ml(R)	0.50
Emetine HCl	0.93 mg	5.40
Ephedrine Sulfate Injection	0.75 mg	6.70
Epinephrine Injection	0.014 mg	357.00
Epinephrine Suspension	0.025 mg	200.00
Ergocalciferol (D2)	142.8 units	0.035
Ergoloid Mesylates	0.004 mg	1250.00
Ergonovine Mateate	6.00 mcg	0.8
Ergotamine Tartrate	0.014 mg	357.00
Erythromycin Gluceptate and Lactobionate	30 mg(R)	0.17
Estradiol (aqueous)	0.02 mg	250.00
Estrogens (Combined) Aqueous	0.026 mg	
	Estrone	192.31
Estrogens Conjugated	0.36 mg	14.00
Estrogenic Substances or Estrogens	0.057 mg	88.00
Estrone Aqueous Suspension	0.057 mg	88.00
Ethacrynate Sodium	1.4 mg	3.60
Ethamivan Injection	5 mg(R)	1.0

Ethylnorepinephrine HU Injection	0.029 mg	172.40
Etidocaine HCl	5.50 mg	0.90
Etidocaine HU and Epinephrine	5.5 mg	0.08
Etomidate Injection	0.6 mg	8.35
Etoposide Injection	2.64 mg	1.90
Evans Blue Injection	0.36 mg	14.00

-F-

Factor IX	50.0 ml(R)	0.10
Fat Emulsion	(10X) 3.2 ml	1.56
	(20X) 1.6 ml	3.13
Fentanyl Citrate	0.15 mg	33.3
Fentanyl Citrate and Droperidol	0.004 mg	
	Fentanyl	1250.00
	7 ml	25.00 +
Ferrous Citrate Fe59 Infection	7 ml	25.00 +
Fibrinogen	30.0 mg(R)	0.17
Fibrinogen, Dried	30.0 mg(R)	0.17
Fibrinolysin and Desoxyribonuclease	1.0 units(R)	5.00
Floxuridine	50 mg(R)	0.10
Fluorescein Sodium Injection	250 mg(R)	0.02
Fluorouracil Infection	12 mg	0.40
Fluphenazine HM	0.05 mg	100.00
Fluphenazine Enanthate or Decanoate	1.43 mg	3.5
Folate Sodium	0.01 mg	500.00
Fructose	10.0 ml(R)	0.50
Fructose and Sodium Chloride	10.0 ml(R)	0.50
Furosemide Injection	1.4 mg	3.60

-G-

Gallamine Triethiodide	1.4 mg	3.60
Gallium Citrate Ga67 Infection	7 ml	25.00 +
Gelatin 6%	1.0 ml(R)	5.00
Gentamicin Sulfate	10 mg(R)	0.50
*Gentamicin Sulfate	0.11mg	45.46
Globulins (Humans)	1.0 ml(R)	5.00
Glucagon for Infection	0.11 mg	45.50
Glycopyrrolate	0.009 mg	555.50
Gold Au198 Infection	7 ml	25.00 +
Gold Sodium Thiomalate Injection	1.0 mg	5.00
Gonadorelin HCl	1.4 mcg	3.60

-H-

Haloperidol, Decanoate and Lactate	0.07 mg	71.4
Hemin for Injection	4.0 mg	1.25
Heparin Sodium and Calcium	2000	USP units(R) 0.003
Heparin Sodium Infection	2000	USP units(R) 0.003

Heparin Lock Flush Solution	10.0 ml(R)	0.50
Heparin and Sodium Chloride	10.0 ml	0.50
Hetacillin Potassium	18 mg(R)	0.30
Hetastarch	20 ml	0.25
Hexafluorenum Bromide Injection	0.6 mg	8.35
Histamine Phosphate	0.04 mg	125.00
Hyaluronate Sodium	0.071 mg	70.42
Hyaluronidase Infection and for Infection	75 USP units(R)	0.07
Hydralazine HCl Injection	3.5 mg	1.45
Hydrocortisone Suspension	4.0 mg	1.25
Hydrocortisone Acetate	1.07 mg	4.67
Hydrocortisone Sodium Phosphate	4.0 mg	1.25
Hydrocortisone Sodium succinate	4.0 mg	1.25
Hydromorphone HCL	0.057 mg	88.00
Hydroxocobalamin	14.30 mcg	0.35
Hydroxyprogesterone Caproate	14.3 mg	0.35
Hydroxystilbamidine Isethionate	4.5 mg	1.10
Hydroxyzine HCl Injection	1.4 mg	3.60
Hyocyamine Sulfate	0.007 mg	714.29
Hyocyamine Sulfate and Scopolamine	0.007 mg	714.29

-I-

Imipenem and Cilastatin	7.14 mg	0.7
Imipramine HCl Injection	1.0 mg	5.00
Immune Serum Globulin	5.5 ml(R)	0.91
Indigotindisulfonate Sodium Injection	1 ml(R)	5.00
*Indium Pentetate In111 Injection	0.5 ml	28.00
Indium Chlorides In113m Injection	2.0 ml	87.50
Indocyanine Green	0.7 mg	7.10
Indomethacin Sodium	0.25 mg	20.00
Insulin	2 units	2.50
Insulin Human	- - -	0.80
Inulin	50 mg	0.10
Invert Sugar	10 ml	0.50
Iodamide meglumine - 24%	4.3 ml	1.20
Iodide Sodium 1123 Solution	7.0 ml	25.00
Iodinated 1125 Albumin Injection	7.0 ml	25.00
Iodide Sodium 1125 Solution	7.0 ml	25.00
Iodinated 1131 Albumin Injection	7.0 ml	25.00
Iodinated 1131 Albumin Aggregated Injection	7.0 ml	25.00
Iodohippurate Sodium 1131 Injection	7.0 ml	25.00
Rose Bengal Sodium 1131 Injection	7.0 ml	25.00
Iodide Sodium 1131 Solution	7.0 ml	25.00
Iodipamide Meglumine Injection – 52%	0.6 ml	8.33
10.5%	1.4 ml	3.60
Iodipamide Meglumine – Diatrizoate meglumine	0.14 ml	35.71

Iohexol	5.0 mg	0.1
Iopamidol	8.34 mg	0.6
*Iophendylate Injection	0.22 ml	0.90
Iothalamate Meglumine Injection	80%- 1.4 ml	3.57
	60%- 2 ml	2.50
	43%- 5.7 ml	0.90
	30%- 4.3 ml	1.16
	17.2% - 5.7 ml	0.90
Iothalamate Meglumine -		
Iothalamate Sodium	52% - 26% 1.5 ml	3.35
Iothalamate Sodium	66.8% - 1.5 ml	3.35
	54.3% - 0.9 ml	5.56
Ioxaglate Meglumine	3.6 ml	1.40
Ioxaglate Sodium	3.6 ml	1.40
Iron Dextran Injection	25 mg(R)	0.20
Iron Sorbitex	0.5 ml(R)	10.00
Isobucaine HU and Epinephrine	0.14 ml	35.70
Isoniazid	30 mg	0.20
Isoproterenol HU Injection	0.029 mg	172.00
Isosulfan Sulfate	0.71 mg	7.00
Isoxsupine HCl Injection	5 mg(R)	1.00

-K-

Kanamycin Sulfate Injection	10 mg(R)	0.50
Ketamine HU	13.0 mg	0.40

-L-

Labetalol HU	4.3 mg	1.20
Leucovorin Calcium Injection	0.071 mg	70.40
Leuprolide Acetate	0.014 mg	357.00
Levallorphan Tartrate Injection	0.04 mg	125.00
Levarterenol(norepinephrine bitartrate)	0.06 mg	83.33
Levorphanol Tartrate Injection	0.20 mg(R)	25.00
Levothyroxine Sodium for Injection	0.007 mg	714.00
Lidocaine HCl Injection (and with D5W)	4.5 mg	1.10
Lidocaine HCl with Epinephrine	1.43 mg	3.50
Lincomycin HU	10 mg	0.50
Liver Derivative Complex	0.03 mg	166.67
Lorazepam	0.05 mg	100.00
Loxapine	0.71 mg	7.00

-M-

Magnesium Sulfate	57.1 mg	0.09
Manganese Chloride Injection	40.0 ug(R)	0.125
Manganese Sulfate	40.0 ug(R)	0.125
Mannitol	10.0 ml(R)	0.50

Mannitol and Sodium Chloride	10.0 ml(R)	0.50
Mechlorethamine HU for Injection	0.4 mg	12.50
Medroxyprogesterone Acetate	14.3 mg	0.35
Menadiol Sodium Diphosphate (K-4)	0.2 mg	25.00
Menadione	0.09 mg	58.30
N. Meningococcal Polysaccharide Pur. Bulk, Group A	0.25 ug(R)	20.00
N.Meningococcal Polysaccharide Pur. Buld, Group C	0.25 ug(R)	20.00
Meningococcal Polysaccharide Vaccine Group A	0.025 ug(R)	200.00
Meningococcal Polysaccharide Vaccine Group C	0.025 ug(R)	200.00
Meningococcal Polysaccharide Vaccine Group A and C	0.05 ug(R)	100.00
Menotropin	2 units (R)	2.50
Meperidine HCl Injection	2.14 mg	2.35
Mephentermine Sulfate	0.64 mg	7.80
Mepivacaine HU	6.6 mg	0.80
Mepivacaine HCl and Levonordefrin	6.6 mg	0.80
Meproamate Injection	1.0 mg	5.0
Meprylcaine HU and Epinephrine	6.6 mg	0.80
Mercaptomerin Sodium	3.57 mg	1.40
Mersalyl with theophylline	2.9 mg	1.72
ldrethoxylline Procaine	2.9 mg	1.72
Mesoridazine Besylate Injection	0.71 mg	7.00
Metaraminol	1.43 mg	3.50
Methadone	0.57 mg	8.80
Methandroil	1.43 mg	3.50
Methapyrilene HCl	0.6 mg	8.33
Methicillin Sodium	60 mg(R)	0.08
Methiodal Sodium Injection	1300 mg(R)	0.004
Methocarbamol Injection	28.6 mg	0.20
Methohexital Sodium	2.0 mg	2.50
Methotrexate Sodium Injection	2.5 mg	2.00
*Methotrexate Sodium Injection	0.5 mg	. 0.40
Methotrimerprazine	0.28 mg	17.90
Methoxamine HCl	0.25 mg	20.00
Methyldopa HCl	10 mg	0.50
Methylene Blue Injection	2 ml	2.50
Methylergonovine Maleate	2.9 mcg	1.70
Methylprednisolone Acetate Suspension	1.7 mg	2.94
Methylprednisolone Sodium Succinate for Injection	30.0 mg	0.17
Metoclopramide	2.0 mg	2.50
Metocurine Iodide	0.4 mg	12.50
Metoprolol Tartrate	0.2 mg	25.00
*Metrizamide	4.29 mg	I 1.17
Metrizamide	634.0 mg	I 0.008

Metrizoic	73% - 2.9 ml	1.72
	46.18% -1.0 ml	5.0
Metronidazole H;1	15.0 mg(R)	0.35
Metyrapone Tartrate Injection	100 mg(R)	0.06
Mezlocillin Sodium	100 mg(R)	0.05
Miconazole Infection	40.0 mg	0.10
*Miconazole Infection	0.29 mg	0.69
Midazolam HU	0.4 mg	12.5
Minocycline HCl	5 mg(R)	1.0
Mithramycin for Injection (Plicamycin)	0.05 mg(R)	100.00
Mitomycin for Injection	0.5 mg(R)	10.00
Molybdenum	2.3 ug	2.17
Morphine Sulfate	0.29 mg	17.00
*Morphine Sulfate	0.06 mg	3.33
Morrhuate Sodium	3.6 mg	1.40
Moxalactam	100.0 mg	0.05
Muromonab-CD3	0.07 mg	71.50

-N-

Nafcillin	80.0 mg(R)	0.06
Nalbuphine HU	0.14 mg	35.7
Nalorphine HU	0.43 mg	11.60
Naloxone HU Injection	0.01 mg	500.00
Nandrolone Decanoate	2.9 mg	1.70
Nandrolone Phenpropionate	1.4 mg	3.60
Neomycin Sulfate	3.8 mg	1.30
Neostigmine Methylsulfate	0.04 mg	125.00
Netilmicin	10 mg(R)	0.50
Niacin	1.43 mg	3.5
Niacinamide Injection	1.43 mg	3.50
Nicotinamide	0.7 mg	7.14
Niketamide	0.9 ml:25% sol	5.56
Nine Vitamin Injection	1.0 ml	5.0
Nitrofurantoin	2.5 mg	2.00
Nitroglycerin	50.0 ug(R)	0.1
Nitroprusside Sodium	1.0 mg(R)	5.00
Norepinephrine bitartrate	0.06 mg	83.35
Novobiocin for Injection	10 mg(R)	0.50

-O-

Opium Alkaloids HU	0.28 mg	17.86
Orphenadrine Citrate Injection	0.86 mg	5.80
Ouabain	0.007 mg	714.2
Oxacillin Sodium	25.0 mg	0.20
Oxymorphone HCl	0.021 mg	238.10
Oxytetracycline	12.5 mg	0.40
Oxytocin	0.14 units	35.70

-P-

Pancuronium Bromide	0.10 mg	50.00
Papaverine HCl	1.7 mg	2.90
Paraldehyde	0.3 ml	17.00
Parathyroid Hormone	0.57 units	8.80
Penicillin G Benzathine Suspension	50,000 units	0.01/100 units
Penicillin G Potassium	50,000 units	0.01/100 units
Penicillin G Procaine and Suspension	68,500 units	0.007/100 units
Penicillin G Sodium	50,000 units	0.01/100 units
Pentagastrin	0.006 mg	833.00
Pentamidine Isethionate	4.0 mg	1.25
Pentobarbital Sodium Injection	7.14 mg	0.70
Pentazocaine	0.29 mg	17.24
Pentazocine Lactate Injection	0.86 mg	5.80
Perphenazine	0.14 mg	35.70
Phenobarbital Sodium Injection	20.0 mg	0.25
Phenolsulfophthalein	0.09 mg	55.60
Phentolamine	0.10 mg	50.00
Phentyletetrizol	7.14 mg	0.70
Phenylephrine HCl	0.20 mg	25.00
Penytoin Sodium Injection	15.0 mg	0.35
Physostigmine Salicylate	0.06 mg	83.40
Phytonadione	.36 mg	14.00
Piperacillin Sodium	75.0 mg	0.07
Piperocaine HCl	4.3 mg	1.16
Plasma Protein Fraction (5X)	10.0 ml(R)	0.5
Plicamycin for Injection	0.05 mg(R)	100.00
Polyestradiol Phosphate	1.10 mg	4.55
Polymyrtin B Sulfate	20,000 units(R)	.03/100 units
*Polymyxin B Sulfate	714 units(R)	.03/100 units
Posterior Pituitary Injection	0.29 units	17.00
Potassium Acetate Injection	0.57 mEq	8.80
Potassium Chloride	0.57 mEq	8.80
Potassium Phosphate Injection	4.43 mg	1.10
Potassium Phosphate in Dextrose	10.0 ml	0.5
Potassium Phosphate in Lactated Ringers	10.0 ml	0.5
Pralidoxine Chloride	40 mg	0.10
Prednisolone Acetate Suspension	0.86 mg	5.81
Prednisolone Acetate and Predaisolone Sodium Phosphate Suspension	1.14 mg	4.39
Prednisolone Sodium Phosphate Injection	0.86 mg	5.80
Predaisolone Sodium Succinate Injection	0.86 mg	5.80
Predaisolone Tebutate Suspension	0.57 mg	8.77
Prilocaine HCl	08.6 mg	0.60

Prilocaine HCl and Epinephrine	2.8 mg	1.80
Procaine HCl	8.6 mg	0.60
Procainamide HCl Injection	14.3 mg	0.35
Prochlorperazine Edisylate Injection	0.28 mg	17.90
Progesterone Aqueous	1.43 mg	3.50
Promazine HU Injection	2.8 mg	1.80
Promethazine HU	1 mg	5.00
Propantheline Bromide	0.43 mg	11.60
Propiomazine HCl Injection	1.10 mg	4.60
Propoxycaine, Procaine HCl & Levonordefrin	6.6 mg	0.80
Propoxycaine, Procaine HCl & Norepinephrine Bitartrate	6.6 mg	0.80
Propranolol HU Injection	0.09 mg	55.60
Protamine Sulfate Injection	5 mg(R)	1.00
Protein Hydrolysate Injection	10.0 ml	0.50
Prothrombin Complex	50.0 units(R)	0.10
Protirelia	7 mcg	0.70
Pyridostigmine Bromide	0.29 mg	17.00
Pyridoxine HCl	25mg	0.20
	-Q-	
Quiaidine Sulfate	8.6 mg	0.60
Quinidine Gluconate	11.4 mg	0.45
	-R-	
Ranitidine HU	0.71 mg	7.00
Reserpine	0.07 mg	71.50
riboflavin	0.7 mg	7.10
ringer's Injection	10.0 ml	0.50
Ringer's in Dextrose	10.0 ml	0.50
ringer's - Lactated Injection	10.0 ml	0.50
Ringer's - Lactated in Dextrose	10.0 ml	0.50
Ritodrine HU	10.0 mg(R)	0.50
Rolitetraacycline for Injection	5 mg(R)	1.00
Rolitetraacycline Nitrate	5 mg(R)	1.00
	-S-	
Saralasin Acetate	0.26 mg	19.2
Secretin	1.0 unit	5.0
Scopolamine HBr	0.009 mg	555.60
Secobarbital Sodium Injection	5.5 mg	0.90
Selenious Acid (Selenium)	1.43 ug	3.5
Selenomethionine Se75 Injection	7.0 ml	25.00 +
Siacalide	0.02 mcg	250.00
Sisomicin Sulfate	10.0 mg	0.50
Sodium Acetate	1.29 mEq	3.90

Sodium Ascorbate	3.57 mg	1.40
Sodium Bicarbonate	4.3 mEq	1.20
Sodium Chloride 0.45-0.9%	10.0 ml(R)	0.50
Sodium Chloride 3- 24.3%	1.4 ml	3.57
Sodium Chloride - Bacteriostatic	5.0 ml(R)	1.0
Sodium Chloride 4.5%- Lactose 3%	10.0 ml(R)	0.50
Sodium Citrate	2.5 mEq	2.0
Sodium Iodide	14.3 mg	0.35
Sodium Lactate	2.4 mEq	2.00
Sodium Phosphate Injection	40 mg PO ₄	0.13
Sodium Phosphate P32 Solution	7.0 ml	25.00
Sodium Salicylate	9.3 mg	0.54
Sodium Tetradecyl Sulfate	0.14 ml	35.71
Sodium Thiosalicylate	2.1 mg	2.38
Sodium Thioaulfate	167 mg	0.03
Somatrem for <i>Injection</i>	0.25 IU	20.00
Somatropin	0.20 IU	25.00
Soybean 011 Emulsion	3.13 ml	1.60
Spectinomycin HU	50 mg(R)	0.10
Streptokinase	3571.43 IU	0.001
Streptokinase-Streptodornase (Local)	3000.0 units(R)	0.002
Streptokinase-Streptodornase (IM)	1000.0 units(R)	0.005
Streptomycin Sulfate	20 mg	0.25
Streptozocin	40.5 mg	0.12
Succinylcholine Chloride	2.5 mg	2.00
Sufentanil citrate	0.04 mg	125.00
Invert Sugar	10.0 ml	0.5
Invert Sugar in Sodium Chloride	10.0 ml	0.5
Sulbactam Sodium	14.3 mg	0.35
Sulfadiazine Sodium	50 mg	0.10
Sulfamethoxazole & Trimethoprim	25 mg(sulf)	0.20
Sulfisozazole Diolamine Injection	80 mg(R)	0.06
Sulfobromophthalein	5 mg	1.00

-T-

Technetium Tc99m Albumin Aggregated Injection	7 ml	25.00
Technetium Tc99m Dsofenin	7.0 ml	25.00
Technetium Tc99m Etidronate Injection	7.0 ml	25.00
Technetium Tc99m Ferpentetate Injection	7.0 ml	25.00
Technetium Tc99m Gluceptate Injection	7.0 ml	25.00
Technetium Tc99m Human Serum Albumin	7.0 ml	25.00
Technetium Tc99m Medronate Injection	7.0 ml	25.00
Technetium Tc99m Ozidronate Injection	7.0 ml	25.00
Technetium Tc99m Pentetate Injection	7.0 ml	25.00
Technetium Tc99m Sodium Pertechnetate	7.0 ml	25.00
Technetium Tc99m Pyrophosphate	7.0 ml	25.00

Technetium Tc99m (Pyro- and trimeta-)		
Phosphates Injection	7.0 ml	25.00
Technetium Tc99m Succimer	7.0 ml	25.00
Technetium Tc99m Sulfur Colloid Injection	7.0 ml	25.00
Terbutaline Sulfate	0.017 mg	50.00
Testolactone Suspension	1.43 mg	3.50
Testosterone (aqueous suspension)	1.43 mg	3.50
*Tetracaine Hydrochloride	0.29 mg	0.70
*Tetracaine HCl and Dextrose	0.2 mg	1.00
Tetracycline HCl	50 mg(R)	1.00
Tetracycline Phosphate Complex	5.0 mg(R)	1.00
Thallos Chloride T1201 Injection	7.0 ml	25.00 +
Theophylline and Dextrose	5.0 mg	1.00
Thiamine HCl	1.43 mg	3.50
Thiamylal Sodium	14.3 mg	0.35
Thiethylperazine Maleate	0.14 mg	35.80
Thiopental Sodium	5.0 mg	1.00
Thiotepa for Infection	0.8 mg	6.20
Thiothizene HU Injection	0.057 mg	88.00
Thyrotropin for Infection	0.14 IU	36.0
Ticarcillin Disodium	100 mg(R)	0.05
Ticarcillin Disodium and Clavulanate	75 mg	0.07
Tobramycin Sulfate	10 mg(R)	0.50
Tolazoline HCl	2 mg	2.60
Tolbulamide Sodium	100 mg(R)	0.05
Triamcinolone Acetate Suspension	1.14 mg	4.39
Triamcinolone Acetonide	1.14 mg	4.39
Triamcinolone Diacetate Suspension	0.7 mg	7.14
Triamcinolone Hexacetonide Suspension	0.29 mg	17.24
Tridihexethyl Chloride	3.00 mg(R)	1.70
Triethylenethiophosphoramidate	0.80 mg	6.25
Triethylperazine Maleate	0.43 mg	11.63
Trifluoperazine HCl Infection	0.029 mg	172.00
Triflupromazine HCl Inejction	0.86 mg	5.80
Trimethaphan Camsylate	5.0 mg(R)	1.00
Trimethobenzamide HCl	20.0 mg(R)	0.25
Tromethamine	500 mg(R)	0.02
Tubocurarine Chloride	0.5 mg	10.00

-U-

Urea	1500 mg	0.003
Urofollitropine	1.06 units	4.70
Urokinase	4,400 IU	0.002

-V-

Vancomycin HCl	15 mg	0.33
Vassopressin	0.29 units	17.00

Vecuronium Bromide	0.12 mg	44.00
Verapamil Hydrochloride	0.3 mg	16.70
Vidarabine for Infection	10 mg(R)	0.50
Vinblastin Sulfate for Infection	0.5 mg	10.00
Vincristine Sulfate for Infection	0.038 mg	132.00
Viomycin Sulfate	14.3 mg	0.35
Vitamin A	714.3 IU	0.007

-W-

Warfarin Sodium for Infection	0.21 mg	24.00
Water for Infection and Sterile WFI	10.0 ml(R)	0.25 +
Bacteriostatic WFI	5.0 ml	0.5 +
Sterile Water for Inhalation	10.0 ml(R)	0.5 +
Sterile Water for Irrigation	10.0 ml(R)	0.25 +

-XYZ-

Xenon Xe133 Infection	2.0 ml	87.50 +
*Ytterbium Yb169 Pentetate Injection	2.5 ml	5.60 +
Zinc Chloride Infection	0.2 mg Zn	25.0
Zinc Sulfate Infection	0.2 mg Zn	25.0

(*) - Intrathecal Injections

(+) - USP Limit NOTE: The limit formula for radiopharmaceuticals is 175/V except for intrathecally administered products 14/V for intrathecal products. V equals the maximum recommended dose (listed in the dose column), in mL, at the expiration date or time.

References:

Facts and Comparisons, Editors E. Kastrup and J. Boyd, Facts and Comparisons, Inc.

United States Pharmacopeia Dispensing Information, Volume 1, 1985, United States Pharmacopeia Convention, Inc.

21 - Code of Federal Regulations

Traducción de capítulo IV

IV. DROGAS HUMANAS Y ANIMALES Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS

Requerimiento General:

Los fabricantes deben usar un reactivo LAL autorizado por CBER en todas las pruebas LAL de validación, en proceso, y en producto terminado.

A. Validación de la prueba LAL

La evaluación de la prueba LAL como una prueba de endotoxina para la puesta en venta de drogas humanas y animales incluye lo siguiente: (1) calificación inicial del laboratorio, y (2) la prueba de inhibición e intensificación.

1. Calificación inicial del laboratorio

Se han descrito varias metodologías para la detección de endotoxina, usando lisado de amebocitos del limulus. Actualmente disponibles comercialmente lisados autorizados usan las técnicas gel clot, cromogénico, punto final turbidimétrico o cinético-turbidimétrico. Otros métodos que han reportado mostrar potencial para incrementar más la sensibilidad del método LAL.

Los fabricantes deben evaluar la variabilidad del laboratorio que examina antes de realizar cualquier prueba oficial. Cada analista que usa cada lote de LAL y cada lote de endotoxina debe realizar la prueba para la confirmación de la sensibilidad rotulada del reactivo LAL o del criterio llevado a cabo. El apéndice A proporciona los procedimientos y criterios para las actuales técnicas autorizadas.

2. Prueba de inhibición e intensificación

El grado de inhibición o intensificación del LAL de un producto se debe determinar para cada formulación de medicamento antes de que la prueba LAL se use para evaluar el contenido de endotoxina de cualquier droga. Toda prueba de validación se debe llevar a cabo en el producto no diluido o en una dilución apropiada. Las diluciones no deben exceder la máxima dilución válida (MVD) (ver apéndice D). Al menos tres lotes de producción de cada producto terminado se deben examinar por inhibición e intensificación.

a) Técnica gel-clot

La prueba inhibición/intensificación se debe realizar de acuerdo a las indicaciones en la sección de preparación de la prueba de endotoxinas bacterianas USP (ver apéndice B). Brevemente, el método comprende tomar una concentración de la droga que contenga variadas concentraciones de un estándar de endotoxina que soporte la sensibilidad del lisado y compararla a unas series de la misma concentración de endotoxina en agua sola. El producto se inocula con endotoxina y se diluye con producto adicional (para que la concentración de la droga permanezca constante) a la misma concentración de endotoxina en agua. Los resultados de la determinación de endotoxina en agua y en el producto deben caer dentro de más/menos una dilución de dos veces la sensibilidad rotulada. Si el producto no diluido muestra inhibición, el producto se puede diluir, no excediendo el MVD, con el mismo diluyente que se usara en la prueba de liberación y en el procedimiento repetido arriba. Controles negativos (diluyente más lisado) se deben incluir en todas las pruebas de inhibición/intensificación.

b) Técnicas cromogénica y punto final-turbidimétrico

En la prueba inhibición/intensificación por estas técnicas, una concentración de la droga que contiene 4 lambda (λ) de concentración del RSE o CSE (lambda es igual a la concentración más baja de endotoxina usada para generar la curva estándar) se prueba en duplicado de acuerdo a la metodología del fabricante del lisado. La curva estándar para estas técnicas debe consistir de al menos cuatro concentraciones de RSE o CSE en agua que se extiendan sobre el rango deseado. Si el rango deseado es más grande que un log, concentraciones adicionales del estándar se deberán incluir. La curva estándar debe satisfacer el criterio para linealidad como se perfila en el apéndice A(2). La cantidad detectada de endotoxina en la droga inoculada debe estar dentro de más o menos 25% de la concentración 4 lambda para la concentración de la droga para no ser considerado ni intensificador ni inhibidor del ensayo. Si el producto no diluido muestra inhibición, el producto se puede diluir, no excediendo la MVD, y repetir la prueba.

Se debe realizar un procedimiento alternativo como se describe arriba excepto que la curva estándar RSE/CSE se prepara en un producto LAL negativo, sin endotoxinas detectables, en lugar de agua LAL negativa. La curva estándar debe satisfacer la prueba de linealidad, r igual o mayor que 0.980, y además la diferencia entre las lecturas D.O. para la concentración más baja y más alta de endotoxina debe ser mayor que 0.4 y menor que 1.5 unidades D.O. Si la curva estándar no satisface estos criterios, el producto no se puede analizar por el procedimiento alternativo.

c) Técnica cinética-turbidimétrica

En la prueba inhibición/intensificación por esta técnica, una concentración de la droga que contiene 4 lambda de concentración del RSE o CSE (lambda es igual a la concentración más baja de endotoxina usada para generar la curva

estándar) se prueba en duplicado de acuerdo a la metodología del fabricante del lisado. La curva estándar para estas técnicas debe consistir de al menos cuatro concentraciones de RSE o CSE en agua que se extiendan sobre el rango deseado. Si el rango deseado es más grande que un log, concentraciones adicionales del estándar se deberán incluir. La curva estándar debe satisfacer el criterio perfilado en el apéndice A(3). Lo calculado significa la cantidad de endotoxina en el producto inoculado, con relación a la curva estándar, debe estar dentro de más o menos 25% para no ser considerado ni intensificador ni inhibidor del ensayo. Si la droga no diluida muestra inhibición o intensificación, la droga se puede diluir, no exceder el MVD, y repetir la prueba. Un procedimiento alterno se debe realizar según se prepara la curva estándar RSE/CSE en la droga o la dilución en lugar de agua. La droga no puede tener una concentración de endotoxina de segundo plano de más de 10% (estimado por la interpolación de la línea de regresión) de la concentración lambda (lambda igual a la concentración más baja usada para generar la curva estándar). La curva estándar debe cumplir la prueba para linealidad, i.e. r igual o menor que $-0,98$, y además la pendiente de la regresión debe ser menor que -0.1 y mayor que -1.0 . Si la curva del estándar no cumple estos criterios, la droga no se puede examinar por el procedimiento alternativo.

En estos casos cuando la droga es manufacturada en varias concentraciones de ingrediente activo mientras los otros componentes de la formulación permanecen constantes, solo se necesita examinar la concentración más alta y la más baja. Si hay una diferencia significativa, i.e. mayor del doble, entre los puntos de inhibición o si la concentración de la droga, por mL, en las soluciones examinadas es diferente, entonces cada concentración remanente debe analizarse. Si la droga muestra inhibición o intensificación en el MDV, cuando se examina por los procedimientos en las secciones de arriba, y es receptiva la examinación por conejo, entonces la prueba de conejo será la prueba apropiada para esa droga. Si las sustancias de inhibición o intensificación se pueden

neutralizar sin afectar la sensibilidad de la prueba o si la prueba LAL es más sensible que la prueba de pirógenos de conejo se puede usar la prueba LAL. Para las drogas no receptivas a la prueba de pirógenos de conejo, el fabricante debe determinar la cantidad más pequeña de endotoxina que se puede detectar. Estos datos deben ser presentados a la oficina de FDA apropiada para revisión.

Las pruebas de inhibición/intensificación se deben repetir en una unidad del producto si el fabricante del lisado se cambia. Si se cambia la técnica del lisado, las pruebas de inhibición e intensificación se deben repetir usando tres lotes. Cuando el proceso de manufacturación, la formulación del producto, la fuente de un ingrediente particular de la formulación de la droga, o el lote de lisado se cambia, el control positivo del producto se puede usar para verificar la validez de la prueba LAL para el producto. Se fomentan los acuerdos de que se está obteniendo un ingrediente de un nuevo fabricante para incluir como parte de su calificación la prueba de pirógenos de conejo para determinar que el ingrediente no contiene pirógenos no-endotoxina.

B. Pruebas de Rutina de Drogas por la prueba LAL.

Las pruebas de producto final se basan en datos de la prueba inhibición/intensificación como se resume en la sección A (2). Las muestras, estándares, controles de producto positivo y negativo se deben examinar al menos por duplicado.

Para la técnica gel -clot, una serie de endotoxina estándar no tiene que ser ejecutada con cada serie de pruebas, si la coherencia de criterios de valoración estándar se ha demostrado en las pruebas.

Debe ejecutarse al menos una vez al día con la primera serie de juegos y repetirse si hay algún cambio en el lote lisado, mucho endotoxina o condiciones de prueba durante el día.

Una serie de endotoxina estándar se debe ejecutar cuando se confirma la contaminación del producto final. Controles positivos del producto (Concentración 2 λ de endotoxina estándar en el producto) deben ser positivos. Si el protocolo indica que se está utilizando la prueba de endotoxina bacteriana (USP), recuerde que se requiere una serie estándar para ejecutarse con cada prueba. La desviación anterior debe tenerse en cuenta en el protocolo de la prueba.

Para las técnicas cromogénica y turbidimétrica de punto final, una serie de endotoxina estándar no tiene que ser ejecutado con cada serie de pruebas, si la coherencia de las curvas de calibración se ha demostrado en el las pruebas de laboratorio. Hay que correr por lo menos una vez al día con la primera serie de pruebas y repetir si hay algún cambio en el lote de lisado, endotoxina o condiciones de prueba durante el día. Sin embargo, al menos, duplicados de una concentración de 4 λ estándar en agua y en cada producto (control positivo del producto) debe ser incluido con cada serie de muestras.

La concentración de endotoxina media de la norma debe estar dentro de más / menos 25% de la concentración real y el control positivo del producto debe cumplir con los mismos criterios que tras la sustracción de cualquier endotoxinas endógenas. Una serie de endotoxina estándar se debe ejecutar cuando se confirma la contaminación del producto final.

Para el ensayo turbidimétrico cinético, no es necesario ejecutar una curva estándar de cada día o cuando se confirme la contaminación del producto final, si la consistencia de las curvas de calibración se ha demostrado con las pruebas en el laboratorio.

Sin embargo, el menos duplicados de una concentración de estándar de 4 lambda en agua y en cada producto (control positivo del producto) debe ser incluido con cada serie de muestras. La concentración de endotoxina media de la norma cuando se calcula utilizando una curva estándar de archivo (véase el apéndice C), debe estar dentro de más/menos 25% de la concentración real y el control positivo del producto debe cumplir con los mismos criterios tras la sustracción de cualquier endotoxina endógena. Si el procedimiento alternativo, se utiliza un estándar en la serie del producto debe realizarse cada vez que se prueba el producto.

Antes de que un nuevo lote de lisado se utilice, la sensibilidad de la etiqueta o los criterios de desempeño deben ser confirmados por el laboratorio, utilizando los procedimientos en el Apéndice A.

La técnica de muestreo seleccionado y el número de unidades a ensayar debe basarse en los procedimientos de fabricación y el tamaño del lote. Un mínimo de tres unidades, lo que representa el principio, medio y final, deben ser probados de un lote. Estas unidades se pueden ejecutar individualmente o agrupados. Si las unidades se agrupan y las endotoxinas se detectan, la repetición de la prueba se puede realizar. La prueba del LAL se puede repetir más de dos veces. La primera consiste en repetir dos veces el número inicial de réplicas de la muestra que se trata de examinar para descartar la posibilidad de que la contaminación extrínseca se produjo en el procedimiento de ensayo inicial. En muestras colectivas, en su caso endotoxina se detecta en la repetición en primer lugar, proceder a la segunda repetición. La segunda repetición consiste en un adicional de 10 unidades de analizarse por separado, ninguna de las 10 unidades de prueba en la segunda repetición puede contener endotoxina en exceso de la concentración límite para el medicamento.

Lo que se presenta a continuación debe ser considerado como el límite de endotoxina para todos los medicamentos parenterales para satisfacer si la prueba del LAL puede ser utilizado como la prueba de endotoxinas para productos finales:

1. K/M: Para cualquier droga administrada por vía parenteral, excepto los administrados por vía intratecal, el límite de endotoxina para la endotoxina se define como K/H, lo que equivale a la cantidad de endotoxina (UE) permitido por ng o ml de producto. K es igual a 5,0 EU / Kg. (Vea el Apéndice D para la definición de M).

Para los medicamentos parenterales que tienen como vía de administración la intratecal:

K es igual a 0,2 EU / Kg.

Medicamentos exentos de los límites de la endotoxina anterior son:

1. Drogas farmacopéicas sujetas a limitaciones de endotoxina establecidas.
2. Medicamentos no oficiales con objeto de solicitudes de nuevo fármaco, aplicaciones de antibióticos de drogas, nuevas aplicaciones de drogas de los animales, y productos biológicos certificados en diferentes límites que han sido aprobado por el organismo.
3. Drogas en investigación o productos biológicos para los que un IND o INAD se ha presentado y aprobado una patente.
4. Drogas o productos biológicos que no pueden ser probados por el método de LAL. Un lote que no pasa la validación de LAL no debe ser analizado por la

prueba de pirógenos en conejos y ponerse en libertad (de distribución) si se aprueba. Debido a la alta variabilidad y la falta de reproducibilidad de la prueba de conejo como un procedimiento de ensayo de la endotoxina, que no consideramos que sea un procedimiento de reevaluación apropiada de los fracasos LAL.

Traducción de Apéndice A

APENDICE A

Procedimiento de control de calidad

Los siguientes procedimientos y criterios se usan para la calificación y recalificación inicial de analistas en el laboratorio, y para probar nuevos lotes de lisado antes de usar.

1) Técnica de punto final gel clot

Para la técnica gel - clot se usaran los procedimientos de la monografía de Pruebas de Endotoxinas Bacteriales USP (ver Apéndice B) para la prueba de control de calidad.

2) Técnicas cromogénica y turbidimétricas de punto final

Cada prueba debe ser dirigida de acuerdo a la metodología específica del fabricante.

Usando el RSE o el CSE cuya potencia se conoce, correr 4 replicas de un set del rango lineal de concentraciones de endotoxina rotulado en la etiqueta. Las concentraciones del estándar deben incluir los límites de la posición más alta y más baja del rango. El análisis de regresión lineal se hace sobre los valores de absorbancia de los estándares (eje y) contra sus respectivas concentraciones de endotoxina (eje x). El coeficiente de correlación, r , debe ser mayor o igual a 0.980. Si r es menor que 0.980 se debe determinar la causa de la no linealidad y repetir la prueba. Este límite de linealidad se usa también para juzgar la validez de las curvas estándar usadas para las pruebas de inhibición/intensificación y las pruebas de la muestra. Además de reunir estos requerimientos, cualquier otra prueba o requerimiento especificado por el fabricante del lisado también se debe unir.

3) Técnica cinética-turbidimétrica

Cada prueba debe ser dirigida de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Usando el RSE o CSE cuya potencia, en unidades de endotoxina (ver Apéndice C), se conoce, ensayar al menos 6 concentraciones por triplicado en el rango 0.03 – 1.0 EU/mL. Si la configuración del instrumento no permite correr las 6 concentraciones a la vez, los datos se pueden obtener en múltiples corridas y combinados. Realizar el análisis de regresión-correlación sobre el log del Tiempo de Reacción (T) contra el log de la concentración de endotoxina (E). El coeficiente de correlación, r , debe ser menos o igual a -0.980. Si r es mayor que -0.980 se debe determinar la causa de la no linealidad y repetir la prueba. Además de reunir estos requerimientos, cualquier otra prueba o requerimientos especificados por el fabricante del lisado también se debe unir.

Nota: el apéndice B se remite al anexo N°3 (versión actual de la prueba de endotoxinas bacterianas)

ANEXO N° 3

**APARTADO 85, “PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS” DE
LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS, EDICIÓN 32 (USP 32)**

cada una de las tres placas con la dilución de prueba media del Estándar (S_3) y cada uno de los nueve cilindros restantes con la dilución de prueba correspondiente (U_3) de la Muestra Desconocida.

Método Turbidimétrico

El día de la valoración, preparar las dosis necesarias diluyendo las soluciones madre del Estándar y de cada Muestra Desconocida según se define en *Preparación del Estándar y Preparación de la Muestra*. Agregar 1,0 mL de cada dosis, excepto en el caso de Gramicidina, Tioestreptón y Tilosina (utilizar 0,10 mL) a cada uno de tres tubos de ensayo preparados y colocar los tres tubos replicados en una posición, elegida al azar, en una gradilla u otro soporte. Incluir de manera similar en cada gradilla uno o dos tubos de control que contengan 1 mL del diluyente de prueba (ver la *Tabla 1*) pero no antibiótico. Una vez completada la gradilla de soluciones de prueba (con Candicidina dentro de los 30 minutos del momento en que se añade el agua a la solución madre de dimetil sulfoxido), agregar 9,0 mL de inóculo a cada tubo de la gradilla y colocar de inmediato la gradilla completada en una incubadora o en un baño de agua mantenidos a una temperatura de 36° a 37,5°, excepto en el caso de la Candicidina (incubar a una temperatura de 27° a 29°). Incubar los tubos durante 4 a 5 horas, excepto en el caso de Capreomicina, Cloranfenicol, Cicloserina, Dihidroestreptomocina, Espectinomocina, Estreptomocina y Troleandomicina (incubar durante 3 a 4 horas), Tilosina (incubar durante 3 a 5 horas) y Candicidina (incubar durante 16 a 18 horas). Después de la incubación, agregar a cada tubo 0,5 mL de formaldehído diluido, excepto en el caso de la Tilosina (calentar la gradilla en un baño de agua a una temperatura de 80° a 90° durante 2 a 6 minutos o en un baño de vapor durante 5 a 10 minutos y llevar a temperatura ambiente), tomando una gradilla a la vez, leer su transmitancia o absorbancia en un espectrofotómetro adecuado equipado con un filtro de 530 nm o 580 nm (ver *Espectrofotómetro en Aparato*).

Para la valoración de un nivel con una curva estándar, preparar diluciones que representen cinco niveles de prueba del Estándar (S_1 a S_5) y un nivel de prueba único (U_3) de cada una de hasta 20 Muestras Desconocidas correspondiente a S_3 del Estándar. Preparar también un S_3 adicional como prueba de crecimiento. Agregar 1 mL de cada dilución de prueba, excepto en el caso de la Gramicidina, Tioestreptón y Tilosina (utilizar 0,10 mL), a tres tubos y 1 mL de diluyente sin antibiótico a seis tubos como controles. Distribuir un conjunto completo, incluyendo dos tubos de controles, a una gradilla, intercalándolos al azar. Agregar 9,0 mL de inóculo, excepto en el caso de Tioestreptón (utilizar 10,0 mL de inóculo), incubar, agregar 0,5 mL de formaldehído diluido y completar la valoración como se indicó anteriormente. Determinar la duración exacta de la incubación observando el crecimiento en la concentración de referencia (dosis media) de las diluciones del estándar (S_3).

CÁLCULO

Para calcular la potencia a partir de los datos obtenidos con el método de cilindro-placa o el método turbidimétrico, proceder en cada caso según se indica en *Potencias Interpoladas a partir de una Curva Estándar* (ver *Diseño y Análisis de Valoraciones Biológicas* (111)), utilizando un método de regresión lineal por mínimos cuadrados y una prueba de linealidad. En aquellos casos en los que se realiza un número de valoraciones del mismo material con la misma curva estándar, calcular el coeficiente de variación en los resultados de todas las valoraciones del material. En aquellos casos en los que se realiza más de una valoración del mismo material con diferentes curvas estándar, promediar los dos o más valores de la potencia.

(85) PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

Partes de este capítulo general han sido armonizadas con los textos correspondientes de la Farmacopea Europea o de la Farmacopea Japonesa. Aquellas partes que no están unificadas están marcadas con los símbolos (,+) para especificar dicha situación.*

Este capítulo describe una prueba para detectar o cuantificar las endotoxinas bacterianas que pueden estar presentes en la muestra de un artículo o artículos a los que se aplica la prueba. Se usa Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) obtenido a partir de extractos acuosos de amebocitos circulantes del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*), preparado y caracterizado para ser utilizado como Reactivo LAL.*+

Hay dos tipos de técnicas para esta prueba: las técnicas de coagulación (gel-clot) que se basan en la formación de un gel y las técnicas fotométricas. Estas últimas comprenden un método turbidimétrico, que se basa en la producción de turbidez después de la ruptura de uniones de un sustrato endógeno y un método cromogénico que se basa en el desarrollo de color después de la ruptura de un complejo sintético péptido-cromógeno. Proceder empleando cualquiera de estas técnicas, a menos que en la monografía se indique algo diferente. Si hubiera discrepancias en los resultados, la decisión final se basa en las técnicas de coagulación, salvo que en la monografía se indique algo diferente.

En las técnicas de coagulación, el punto final de la reacción se determina a partir de diluciones del material en análisis comparándolas directamente con diluciones en paralelo de una endotoxina de referencia, y las cantidades de endotoxina se expresan como Unidades USP de Endotoxinas (UE-USP). [NOTA—Una UE-USP es igual a una UI (Unidad Internacional) de endotoxinas.]

Debido a que los Reactivos LAL han sido formulados para ser utilizados también en pruebas turbidimétricas o colorimétricas, dichas pruebas se pueden emplear para cumplir con los requisitos. Estas pruebas requieren que se establezca una curva de regresión estándar; el contenido de endotoxina del material de prueba se determina por interpolación de la curva. Los procedimientos incluyen la incubación durante un período predeterminado de la endotoxina de reacción y de soluciones de control con Reactivo LAL y la lectura de la absorbancia de la luz espectrofotométrica a longitudes de onda adecuadas. En el procedimiento turbidimétrico de punto final la lectura se hace inmediatamente al final del período de incubación. En el procedimiento colorimétrico de punto final la reacción se detiene al final del período preseleccionado mediante el agregado de un agente que detiene la reacción enzimática antes de realizar las lecturas. En los ensayos cinéticos colorimétricos y turbidimétricos la absorbancia se mide durante el período de reacción y los valores de velocidad se determinan a partir de esas lecturas.

APARATOS Y MATERIAL DE VIDRIO

Eliminar los pirógenos de todo el material de vidrio y otros materiales termoestables en una estufa de aire caliente mediante un proceso validado.*+. El tiempo y la temperatura mínimos que se usan habitualmente son 30 minutos a 250°. Si se emplean aparatos de plástico, tales como microplacas y puntas para pipetas automáticas, usar sólo los que se han demostrado que están exentos de endotoxinas detectables y que no interfieren con la prueba. [NOTA—En este

* El Reactivo LAL reacciona con algunos β -glucanos además de reaccionar con las endotoxinas. Algunas preparaciones que están tratadas no reaccionan con β -glucanos y se deben usar para muestras que contengan glucanos.*

*+ Para realizar una prueba de validez del procedimiento para inactivar endotoxinas, ver *Esterilización por Calor Seco en Esterilización y Garantía de Esterilidad de Artículos Farmacopéuticos* (1211). Usar un Reactivo LAL con una sensibilidad no menor de 0,15 Unidades de Endotoxinas por mL.*

capítulo, el término "tubo" incluye cualquier otro receptáculo, como por ejemplo los pocillos de las placas de microtitulación.]

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR DE ENDOTOXINA Y LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR

El ER Endotoxina USP tiene una potencia definida de 10 000 Unidades USP de Endotoxina (UE) por vial. Reconstituir todo el contenido de 1 vial de ERE (Estándar de referencia de endotoxina) con 5 mL de Agua Reactivo para LAL⁴³, mezclar intermitentemente durante 30 minutos con un mezclador por vórtice y usar este concentrado para hacer diluciones en serie adecuadas. Conservar el concentrado en un refrigerador durante no más de 14 días para preparar diluciones posteriores. Mezclar vigorosamente con un mezclador por vórtice durante no menos de 3 minutos antes de usar. Mezclar cada dilución durante no menos de 30 segundos antes de preparar la siguiente dilución. Debido a la pérdida de actividad por adsorción, no almacenar las diluciones en ausencia de datos que respalden lo contrario.

Pruebas Preparatorias

Usar un Reactivo LAL cuya sensibilidad declarada en la etiqueta haya sido confirmada.

La validez de los resultados de la prueba de endotoxinas bacterianas requiere una adecuada demostración de que las muestras del artículo o de las soluciones, los lavados o los extractos de los mismos, a los que se les realizará la prueba, no inhiben ni potencian por sí mismos la reacción, ni interfieren con la prueba de ninguna otra manera. La validación se lleva a cabo realizando la prueba de inhibición o potenciación descrita en cada una de las tres técnicas indicadas. Se incluyen controles negativos adecuados. La validación debe repetirse si se cambia la fuente de Reactivo LAL o el método de fabricación o formulación del artículo.

Preparación de las Soluciones de Prueba

Preparar soluciones de prueba disolviendo o diluyendo fármacos o extrayendo dispositivos médicos utilizando Agua Reactivo para LAL. Algunas sustancias o preparaciones se pueden disolver, diluir o extraer de un modo más adecuado en otras soluciones acuosas. Si fuera necesario, ajustar el pH de la solución (o de la dilución) que se va a examinar de modo que el pH de la mezcla del Reactivo LAL y la muestra se encuentre dentro del intervalo de pH especificado por el fabricante del Reactivo LAL. Esto se aplica habitualmente a un producto con un pH comprendido entre 6,0 y 8,0. El pH se puede ajustar con un ácido, una base o una solución amortiguadora adecuada según lo recomiende el fabricante del Reactivo LAL. Los ácidos y las bases se pueden preparar a partir de concentrados o sólidos con Agua Reactivo para LAL en recipientes exentos de endotoxinas detectables. Las soluciones amortiguadoras se deben validar para garantizar que están libres de endotoxinas detectables y otros factores de interferencia.

DETERMINACIÓN DE LA MÁXIMA DILUCIÓN VÁLIDA (MDV)

La Máxima Dilución Válida es la dilución máxima permitida de una muestra a la que se le puede determinar el límite de endotoxina. Se aplica a soluciones inyectables o soluciones de administración parenteral en la forma reconstituida o diluida para administración, o, cuando corresponda, a la cantidad de fármaco en peso si el volu-

men de la forma farmacéutica para administración pudiera variar. La ecuación general para determinar la MDV es:

$$MDV = (\text{Límite de endotoxina} \times \text{Concentración de la solución de muestra}) / (\lambda)$$

donde la concentración de la solución de muestra y λ se corresponden con las definiciones dadas a continuación. Cuando en una monografía individual se especifique la concentración límite de endotoxina por volumen (en UE por mL), se debe dividir el límite por λ , que representa la sensibilidad declarada en la etiqueta (en UE por mL) del Reactivo LAL, para obtener el factor MDV. Si en la monografía individual se especifica la concentración límite de endotoxina en términos de peso o Unidades de fármaco activo (en UE por mg o en UE por Unidad), multiplicar el límite por la concentración (en mg por mL o en Unidades por mL) del fármaco en la solución sometida a prueba o del fármaco reconstituido según las instrucciones de la etiqueta, según corresponda, y dividir el producto de la multiplicación por λ , para obtener el factor MDV. El factor MDV así obtenido es el factor de dilución límite de la preparación para que la prueba sea válida.

DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE ENDOTOXINA

El límite de endotoxina para fármacos de administración parenteral, definido en base a la dosis, es igual a K/M ,⁴⁴ en donde K es el umbral de la dosis pirogénica de endotoxina por kg de peso corporal en seres humanos, y M es igual a la dosis máxima recomendada para seres humanos de un producto por kg de peso corporal durante un período de una hora.

El límite de endotoxina para fármacos de administración parenteral se especifica en las monografías individuales en unidades como por ejemplo UE/mL, UE/mg, o UE/Unidad de actividad biológica.

TÉCNICAS DE COAGULACIÓN

Las técnicas de coagulación detectan o cuantifican las endotoxinas basándose en la coagulación del Reactivo LAL en presencia de la endotoxina. La concentración de endotoxina necesaria para que el lisado se aglutine en condiciones estándar, es la sensibilidad declarada en la etiqueta del Reactivo LAL. Para asegurar tanto la precisión como la validez de la prueba, en *Pruebas Preparatorias para las Técnicas de Coagulación* se describen las pruebas para confirmar la sensibilidad declarada en la etiqueta del Reactivo LAL y para los factores de interferencia.

Pruebas Preparatorias para las Técnicas de Coagulación

Prueba de Confirmación de la Sensibilidad Declarada en la Etiqueta del Reactivo LAL—Confirmar la sensibilidad declarada en la etiqueta utilizando por lo menos 1 vial del lote de Reactivo LAL. Preparar una serie de diluciones dobles de ER Endotoxina USP en Agua Reactivo para LAL para obtener concentraciones de 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$, en donde λ corresponde a lo definido anteriormente. Efectuar la prueba por cuadruplicado sobre cada una de las cuatro concentraciones estándar e incluir controles negativos. La prueba de confirmación de sensibilidad del lisado se debe llevar a cabo cuando se usa una partida nueva de Reactivo LAL o cuando hay algún cambio en las condiciones experimentales que puedan afectar el resultado de la prueba.

Mezclar un volumen del Reactivo LAL con un volumen igual (como por ejemplo alícuotas de 0,1 mL) de una de las soluciones estándar en cada tubo de ensayo. Cuando se usen viales o ampollas de prueba individuales que contengan Reactivo LAL liofilizado,

⁴³ Agua Estéril para Inyección u otro tipo de agua que no presente ninguna reacción con el Reactivo LAL específico con el que se va a usar, al límite de sensibilidad de dicho reactivo.

⁴⁴ K es 5 UE-USP/kg para cualquier vía de administración que no sea la intratecal (para la cual K es 0,2 UE-USP/kg de peso corporal). En el caso de productos radiofarmacéuticos que no se administren por vía intratecal, el límite de endotoxina se calcula como $175/V$, donde V es la dosis máxima recomendada en mL. En el caso de radiofármacos administrados por vía intratecal, el límite de endotoxina se obtiene mediante la fórmula $14/V$. Para formulaciones (habitualmente productos oncológicos) que se administran por metro cuadrado de superficie corporal, la fórmula es K/M , en donde $K = 5$ UE/kg y M es la (dosis máxima/m²/hora \times 1,80 m²)/70 Kg. +

agregar directamente las soluciones al vial o a la ampolla. Incubar la mezcla de reacción durante un período constante según las instrucciones del fabricante del Reactivo LAL (habitualmente a $37 \pm 1^\circ$ durante 60 ± 2 minutos), evitando vibraciones. Para analizar la integridad del gel, sacar uno a uno los tubos directamente de la incubadora y con un único movimiento suave, invertirlos aproximadamente 180° . Si se ha formado un gel firme que permanece en su lugar después de invertir los tubos; registrar el resultado como positivo. Un resultado es negativo si no se forma un gel con esas características. La prueba no es válida a menos que la concentración más baja de las soluciones estándar muestre un resultado negativo en todas las pruebas repetidas.

El punto final es la última prueba positiva en la serie de concentraciones decrecientes de endotoxina. Calcular el valor medio de los logaritmos de la concentración en el punto final y luego el antilogaritmo del valor medio usando la ecuación siguiente:

$$\text{Media Geométrica de la Concentración del Punto Final} = \text{antilogaritmo } (\Sigma e / f)$$

donde Σe es la suma de los logaritmos de las concentraciones de punto final de la serie de dilución utilizada, y f es el número de tubos de ensayo repetidos. La media geométrica de la concentración del punto final es la sensibilidad medida del Reactivo LAL (en UE/mL). Si no es menor de $0,5\lambda$ y no es mayor de 2λ , se confirma la sensibilidad declarada en la etiqueta y se usa en pruebas realizadas con este lisado.

Prueba de Factores de Interferencia para las Técnicas de Coagulación—Preparar soluciones A, B, C y D como se muestra en la *Tabla 1* y realizar la prueba de inhibición o potenciación en las soluciones de muestra a una dilución menor que la MDV, que no contenga endotoxinas detectables, siguiendo el procedimiento indicado antes en la *Prueba de Confirmación de la Sensibilidad Declarada en la Etiqueta del Reactivo LAL*. La media geométrica de las concentraciones del punto final de las soluciones B y C se determina empleando la ecuación de esa prueba.

Esta prueba se debe repetir cuando cambia cualquier condición que pueda influir sobre los resultados de la misma. Esta prueba no es válida a menos que las Soluciones A y D no muestren ninguna reacción y el resultado de la Solución C confirme la sensibilidad declarada en la etiqueta.

Si la sensibilidad del lisado determinada en presencia de la solución de muestra en análisis de la Solución B no es menor de $0,5\lambda$ y no es mayor de 2λ , la solución de muestra no contiene factores que interfieran en las condiciones experimentales utilizadas. En caso contrario, la solución de muestra que se va a examinar interfiere con la prueba.

Si la muestra en análisis no cumple con la prueba a una dilución menor que la MDV, repetir la prueba empleando una dilución mayor que no exceda la MDV. El uso de un lisado de mayor sensi-

bilidad permite una dilución mayor de la muestra que se va a examinar y esto puede contribuir a la eliminación de la interferencia.

La interferencia se puede solucionar mediante un tratamiento adecuado, como filtración, neutralización, diálisis o calentamiento. Para establecer que el tratamiento elegido elimina eficazmente la interferencia sin pérdida de endotoxinas, realizar la valoración que se describe a continuación utilizando la preparación a examinar, a la que se ha agregado ER Endotoxina USP y ha sido sometida al tratamiento seleccionado.

Prueba de Límite de Coagulación

Esta prueba se utiliza cuando una monografía contiene un requisito respecto al límite de endotoxina.

Procedimiento—Preparar las Soluciones A, B, C y D como se indica en la *Tabla 2* y llevar a cabo la prueba en estas soluciones siguiendo el procedimiento de la *Prueba de Confirmación de la Sensibilidad Declarada en la Etiqueta del Reactivo LAL en Pruebas Preparatorias para las Técnicas de Coagulación*.

Tabla 2. Preparación de Soluciones para la Prueba de Límite de Coagulación

Solución*	Concentración de Endotoxina/Solución a la que se Agrega Endotoxina	Número de Repeticiones
A	ninguna/solución de muestra diluida	2
B	2λ /solución de muestra diluida	2
C	2λ /Agua Reactivo para LAL	2
D	ninguna/Agua Reactivo para LAL	2

* Preparar la Solución A y la Solución B de control positivo del producto utilizando una dilución no mayor que la MDV y tratamientos como se indica en la *Prueba de Factores de Interferencia para las Técnicas de Coagulación en Pruebas Preparatorias para las Técnicas de Coagulación*. Las Soluciones B y C de control positivo contienen la preparación de endotoxina estándar a una concentración que corresponde al doble de la sensibilidad declarada en la etiqueta del Reactivo LAL. La Solución D de control negativo es Agua Reactivo para LAL.

Interpretación—La prueba no es válida a menos que ambas determinaciones repetidas de las Soluciones B y C de control positivo sean positivas y la Solución D de control negativo sea negativa. La preparación en análisis cumple con la prueba si se obtiene un resultado negativo en ambos tubos que contienen la Solución A. La preparación en análisis no cumple con la prueba si se obtiene un resultado positivo en ambos tubos que contienen la Solución A.

Repetir la prueba cuando se obtenga un resultado positivo en 1 tubo que contenga la Solución A y un resultado negativo en el otro. La preparación en análisis cumple con la prueba cuando se obtiene un resultado negativo en ambos tubos que contienen la Solución A

Tabla 1. Preparación de Soluciones para la Prueba de Inhibición/Potenciación para Técnicas de Coagulación

Solución	Concentración de Endotoxina/Solución a la que se Agrega		Factor de Dilución	Concentración Inicial de Endotoxina	Número de Repeticiones
	Endotoxina	Diluyente			
A ^a	ninguna/solución de muestra	—	—	—	4
B ^b	2λ /solución de muestra	solución de muestra	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	$0,5\lambda$	4
			8	$0,25\lambda$	4
C ^c	2λ /agua para BET	Agua Reactivo para LAL	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	$0,5\lambda$	2
			8	$0,25\lambda$	2
D ^d	ninguna/Agua Reactivo para LAL	—	—	—	2

^a Solución A: una solución de muestra de la preparación en análisis que está exenta de endotoxinas detectables.

^b Solución B: prueba de interferencia.

^c Solución C: control de la sensibilidad declarada en la etiqueta del Reactivo LAL.

^d Solución D: control negativo de Agua Reactivo para LAL.

en el resultado de la repetición. Si la prueba es positiva para la preparación en análisis a una dilución menor que la MDV, se puede repetir la prueba a una dilución que no sea mayor que la MDV.

Ensayo de Coagulación

Este ensayo cuantifica endotoxinas bacterianas en soluciones de muestras por titulación hasta punto final.

Procedimiento—Preparar Soluciones A, B, C y D como se indica en la *Tabla 3* y analizar siguiendo el procedimiento en la *Prueba de Confirmación de la Sensibilidad Declarada en la Etiqueta del Reactivo LAL en Pruebas Preparatorias para las Técnicas de Coagulación*.

Cálculo e Interpretación—La prueba no es válida a menos que se cumplan las siguientes condiciones: (1) ambas determinaciones repetidas de la Solución D de control negativo son negativas; (2) ambas determinaciones repetidas de la Solución B de control positivo del producto son positivas; y (3) la media geométrica de la concentración de punto final de la Solución C está comprendida en el intervalo de $0,5\lambda$ a 2λ .

Para determinar la concentración de endotoxinas de la Solución A, calcular la concentración del punto final para cada serie de determinaciones repetidas de las diluciones multiplicando cada factor de dilución del punto final por λ . La concentración de endotoxina en la muestra es la media geométrica de la concentración de punto final de las determinaciones repetidas (ver la fórmula proporcionada en la *Prueba de Confirmación de la Sensibilidad Declarada en la Etiqueta del Reactivo LAL en Pruebas Preparatorias para las Técnicas de Coagulación*). Si la prueba se realiza con una solución de muestra diluida, calcular la concentración de endotoxinas en la solución de muestra original multiplicando por el factor de dilución. Si ninguna de las diluciones de la solución de muestra es positiva en un ensayo válido, informar la concentración de endotoxina como menor que λ (si se analizó la muestra diluida, menor que λ por el factor de dilución más bajo de la muestra). Si todas las diluciones son positivas, la concentración de endotoxina se informa como igual o mayor que el factor de dilución mayor multiplicado por λ (por ejemplo, el factor de dilución inicial multiplicado por 8 veces λ en la *Tabla 3*).

El artículo cumple con los requisitos de la prueba si la concentración de endotoxinas es menor que la que se especifica en la monografía individual.

TÉCNICAS FOTOMÉTRICAS

El método turbidimétrico mide el aumento en la turbidez. Dependiendo del principio de prueba empleado, esta técnica se clasifica como turbidimétrica de punto final o turbidimétrica cinética. La técnica turbidimétrica de punto final se basa en la relación cuantitativa entre la concentración de endotoxinas y la turbidez (absorbancia o transmisión) de la mezcla de reacción al término de un período de incubación. La técnica turbidimétrica cinética es un método para medir el tiempo de iniciación que se necesita para alcanzar una absorbancia predeterminada de la mezcla de reacción o la velocidad de producción de turbidez.

El método cromogénico mide el cromóforo liberado a partir de un péptido cromogénico adecuado por medio de la reacción de las endotoxinas con el Reactivo LAL. Según el principio de prueba empleado, esta técnica se clasifica como cromogénica de punto final o cromogénica cinética. La técnica cromogénica de punto final se basa en la relación cuantitativa entre la concentración de endotoxinas y la liberación del cromóforo al término de un período de incubación. La técnica cromogénica cinética es un método para medir el tiempo de iniciación que se necesita para alcanzar una absorbancia predeterminada de la mezcla de reacción o la velocidad de aparición de color.

Todas las pruebas fotométricas se llevan a cabo a la temperatura de incubación recomendada por el fabricante del Reactivo LAL, que generalmente es $37 \pm 1^\circ$.

Pruebas Preparatorias para las Técnicas Fotométricas

Para asegurar la precisión o validez de las técnicas turbidimétricas y cromogénicas, se realizan las pruebas preparatorias para verificar que los criterios para la curva estándar son válidos y que la solución de muestra no inhibe ni potencia la reacción. Cuando cambian las condiciones que pueden influir en el resultado de la prueba es necesaria la revalidación del método.

Verificación de los Criterios para la Curva Estándar—Utilizando la Solución de Endotoxina Estándar, preparar por lo menos tres concentraciones de endotoxinas para generar la curva estándar. Realizar la prueba usando por lo menos tres determinaciones repetidas de cada concentración de endotoxina estándar siguiendo las instrucciones del fabricante del Reactivo LAL (con respecto a relacio-

Tabla 3. Preparación de Soluciones para el Ensayo de Coagulación

Solución	Concentración de Endotoxina/ Solución a la que se le Agrega Endotoxina	Diluyente	Factor de Dilución	Concentración Inicial de Endotoxina	Número de Repetición
A ^a	ninguna/solución de muestra	Agua Reactivo para LAL	1	—	2
			2	—	2
			4	—	2
			8	—	2
B ^b	2 λ /solución de muestra	—	1	2 λ	2
C ^c	2 λ /Agua Reactivo para LAL	Agua Reactivo para LAL	1	2 λ	2
			2	1 λ	2
			4	0,5 λ	2
			8	0,25 λ	2
D ^d	ninguna/Agua Reactivo para LAL	—	—	—	2

^a Solución A: una solución de la muestra en análisis a la dilución, que no exceda la MDV, con la que se completó la *Prueba de Factores de Interferencia para las Técnicas de Coagulación*. Las diluciones subsiguientes de la solución de muestra no deben exceder la MDV. Usar Agua Reactivo para LAL para hacer series de diluciones de cuatro tubos que contengan la solución de muestra en análisis a concentraciones de 1, 1/2, 1/4 y 1/8 con respecto a la dilución con la que se completó la *Prueba de Factores de Interferencia para Técnicas de Coagulación*. Se pueden utilizar otras diluciones, según corresponda.

^b Solución B: Solución A que contenga endotoxina estándar a una concentración de 2 λ (control positivo del producto).

^c Solución C: dos series de 4 tubos de Agua Reactivo para LAL que contenga la endotoxina estándar a una concentración de 2 λ , λ , 0,5 λ y 0,25 λ , respectivamente.

^d Solución D: Agua Reactivo para LAL. (control negativo).

de volumen, tiempo de incubación, temperatura, pH, etc.). Si el intervalo deseado en los métodos cinéticos es mayor de dos logaritmos, se deben incluir estándares adicionales para enmarcar cada aumento logarítmico dentro del intervalo de la curva estándar. El valor absoluto del coeficiente de correlación, $-r-$, debe ser mayor o igual a 0,980 para el intervalo de concentraciones de endotoxina indicado por el fabricante del Reactivo LAL.

Prueba de Factores de Interferencia para las Técnicas Fotométricas—Seleccionar una concentración de endotoxina en o cerca de la mitad de la curva estándar de endotoxina. Preparar las soluciones A, B, C y D como se indica en la *Tabla 4*. Llevar a cabo la prueba en las Soluciones A, B, C y D por lo menos en duplicado según las instrucciones del Reactivo LAL utilizado (con respecto al volumen de la muestra y del Reactivo LAL, la relación entre el volumen de la muestra y el del Reactivo LAL, el tiempo de incubación; etc.).

Calcular la recuperación media de la endotoxina agregada restando la concentración media de endotoxina en la solución (si la hubiera) de la que contenga la endotoxina agregada. Para considerar que no presenta factores de interferencia en las condiciones de la prueba, la concentración medida de la endotoxina agregada a la solución de muestra debe estar dentro del 50% al 200% de la concentración conocida de endotoxina agregada después de restar la endotoxina detectada en la solución sin la endotoxina agregada.

Cuando la recuperación de endotoxina se encuentra fuera de los intervalos especificados, se deben eliminar los factores de interferencia como se describe en la *Prueba de Factores de Interferencia para las Técnicas de Coagulación en Pruebas Preparatorias para las Técnicas de Coagulación*. La repetición de la *Prueba de Factores de Interferencia para las Técnicas de Coagulación* valida el tratamiento.

Procedimiento para las Técnicas Fotométricas

Seguir el procedimiento descrito en la *Prueba de Factores de Interferencia para las Técnicas Fotométricas en Pruebas Preparatorias para Técnicas Fotométricas*.

Cálculos para las Técnicas Fotométricas

Calcular la concentración de endotoxina de cada una de las determinaciones repetidas de la Solución de Prueba A utilizando la curva estándar generada por la serie de control positivo C. La prueba no es válida a menos que se cumplan las siguientes condiciones: (1) los resultados de la serie de control C cumplen con los requisitos de validación definidos en *Verificación de Criterios para la Curva Estándar en Pruebas Preparatorias para Técnicas Fotométricas*; (2) la recuperación de endotoxina, calculada a partir de la concentración encontrada en la Solución B después de restar la concentración de endotoxina encontrada en la Solución A está entre 50% y 200%; y (3) el resultado de la serie de control negativo D no excede el límite del valor blanco requerido en la descripción del Reactivo LAL utilizado.

Interpretación de Resultados a partir de las Técnicas Fotométricas

En los ensayos fotométricos, la preparación en análisis cumple con la prueba si la concentración media de endotoxinas de las determinaciones repetidas de la Solución A, después de la corrección por dilución y concentración, es menor que el límite de endotoxina para el producto.

Tabla 4. Preparación de Soluciones para la Prueba de Inhibición/Potenciación para Técnicas Fotométricas

Solución	Concentración de Endotoxinas	Solución a la que se Agrega la Endotoxina	Número de Repeticiones
A ^a	ninguna	solución de muestra	no menos de 2
B ^b	concentración media de la curva estándar	solución de muestra	no menos de 2
C ^c	al menos 3 concentraciones (la concentración más baja se denomina λ)	Agua Reactivo para LAL	cada una no menos de 2
D ^d	ninguna	Agua Reactivo para LAL	no menos de 2

Solución A: la solución de muestra se puede diluir pero no debe exceder la MDV.

Solución B: la preparación en análisis a la misma dilución que la Solución A, que contiene endotoxina agregada a una concentración igual o cercana a la mitad de la curva estándar.

Solución C: la endotoxina estándar a las concentraciones utilizadas en la validación del método descrito en *Verificación de Criterios para la Curva Estándar en Pruebas Preparatorias para Técnicas Fotométricas* (serie de control positivo).

Solución D: Agua Reactivo para LAL (control negativo).

ANEXO N° 4
FORMATOS DE CUADROS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Confirmación de sensibilidad

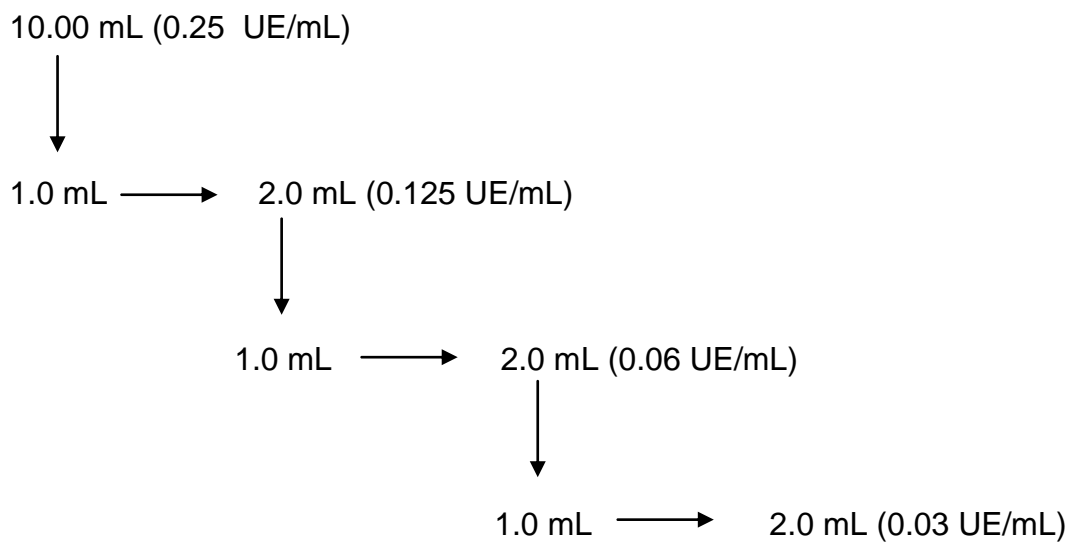
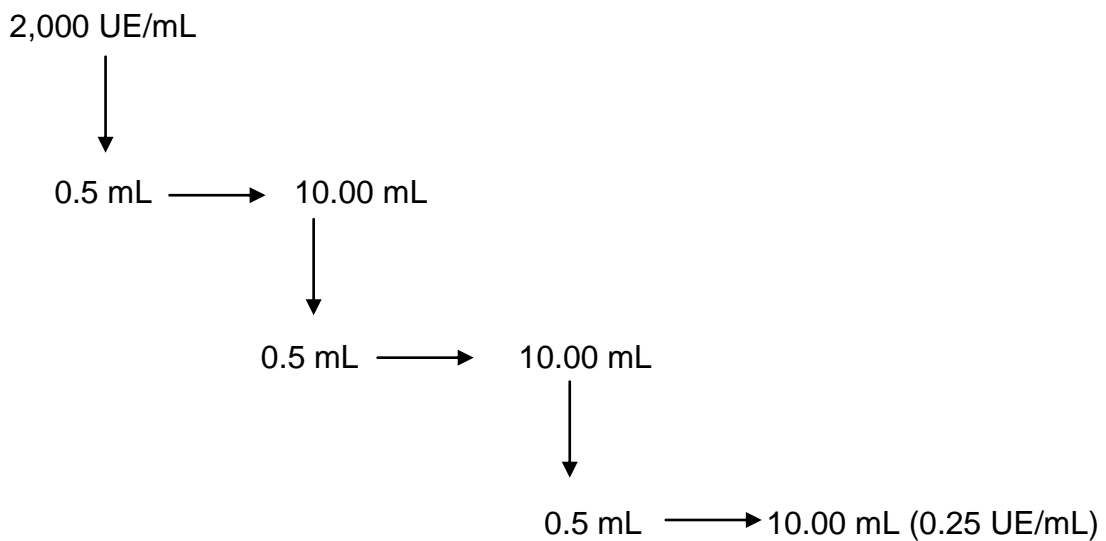
Nº de réplicas	2λ	λ	0.5λ	0.25λ	Punto Final	Log 10 Punto Final
1						
2						
3						
4						
				Sumatoria		
				promedio		

Prueba de límite de coagulación

Nº de réplicas	soluciones				Resultados esperados			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1					-	+	+	-
2					-	+	+	-

ANEXO N°5
CASCADAS DE DILUCIONES DEL CONTROL ESTANDAR DE
ENDOTOXINAS

Cada vial de CEE rotula 10,000 UE/5mL, equivalente a 2,000 UE/mL al reconstituirlo.



ANEXO N°6
CERTIFICADO DE COMPILACIÓN DE CONTROL ESTÁNDAR DE
ENDOTOXINA



Control Standard Endotoxin (CSE)
Certificate of Compliance

The lot of CSE listed below was manufactured in accordance with written procedures.

CSE lot #: 121
Source: *Escherichia coli* O113:H10
Concentration: 0.5 µg/vial
Fillers: None
Catalog #: E0005
Expiration Date: 29 JAN 2015

This lot of CSE meets the specifications of Associates of Cape Cod, Inc.


Quality Review


Quality Review

ANEXO N° 7

CERTIFICADO DE COMPILACIÓN DE AGUA GRADO REACTIVO LAL



LAL Reagent Water (LRW)
Certificate of Compliance

LRW Lot #: 314-3665
Catalog #: W0504 / W050P
Date of Expiration: 15 JAN 2011

This lot of LRW has less than 0.001 EU/mL endotoxin and less than 1.56 pg/mL of (1,3)- β -D-glucan. It meets the specifications of Associates of Cape Cod, Inc. for use as an LAL Reagent Water.


Quality Review


Quality Review



QC014

Rev. 008, Oct 2008
CCF 7735

ANEXO N° 8
CERTIFICADO DE COMPILACIÓN DE LISADO DE AMEBOCITOS DE
LIMULUS PYROTEL®

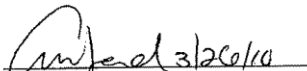


Pyrotell® *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL)
Certificate of Compliance

The lot of Pyrotell listed below meets the written requirements for sterility, moisture, pH, and endotoxin sensitivity.

Pyrotell lot #: 510-02-528
Catalog #: G5125
Sensitivity: 0.125 EU/mL
Expiration Date: 22 FEB 2015

This lot of Pyrotell has been released for sale by the Center for Biologics Evaluation and Research, U.S. F.D.A.


Quality Review


Quality Review

QC051

Rev. 004

ANEXO N° 9

**CERTIFICADO DE ESTANDARIZACIÓN DE CONTROL ESTÁNDAR DE
ENDOTOXINA FRENTE AL ESTÁNDAR DE REFERENCIA DE
ENDOTOXINA PYROTEL®.**



CERTIFICATE OF ANALYSIS
Standardization of CSE against RSE
Pyrotell® Gel-Clot Method

ACC Internal Control Number: QC-0510-131
Test date: 05/24/2010

Reagent	Sensitivity (EU/mL)	Catalog No.	Lot No.	Exp. Date
Pyrotell®	0.125	G5125	510-02-528	22 FEB 2015
Control Standard Endotoxin (CSE), 0.5 µg/vial (= 500 ng/vial)		E0005	121	29 JAN 2015
Reference Standard Endotoxin (RSE)		N/A	EC-6-3	N/A

Potency of CSE (per ng)	5 EU/ng or 5 IU/ng
Potency of CSE (per vial)	5 EU/ng x 500 ng/vial = 2,500 EU/vial or 2,500 IU/vial

If the CSE is reconstituted with 5 mL, the endotoxin concentration will be 500 EU/mL.

To obtain a CSE concentration of 1,000 EU/mL, reconstitute the vial with 2.5 mL of LAL Reagent Water.

 <hr/> Quality Assurance	5/24/10 <hr/> Date
 <hr/> Quality Assurance	5/25/10 <hr/> Date

Notes:

1. The stated potency applies only to the combination of CSE and LAL lots specified on this certificate.
2. The equivalence of the EU and IU is stated in the USP Bacterial Endotoxins Test chapter, <85>, and in the EP Bacterial Endotoxins chapter, 2.6.14.
3. Potency is subject to change within the error of the test at any time.

Form QC004-Pyrotell-0.5, Revision 3, August 2009

ANEXO N° 10
CARTAS DE ENTREGA DE MANUAL DE PROCEDIMIENTO DE
VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANA (LAL) POR
EL METODO GEL – CLOT.

Ciudad Universitaria, Agosto de 2011

MSC. Eliseo Ernesto Ayala Mejía
Coordinador de la asignatura
Control de calidad de productos farmacéuticos y veterinarios I
Presente

Estimado Maestro Ayala.


Reciba un cordial saludo esperando que todas sus actividades se estén realizando de la mejor manera posible.

El motivo de la presente es para hacerle entrega de tres ejemplares del: **Manual de Procedimiento de Validación de la Prueba de Endotoxina Bacteriana (LAL) por el Método Gel – Clot.** Como parte de cumplimiento del quinto objetivo del trabajo de graduación para optar al grado de licenciatura en química y farmacia, denominado: Validación de la prueba de endotoxina bacteriana (LAL) por el método Gel – Clot utilizando el producto Furosemida (20mg) inyectable; los cuales tienen que ser entregado a los coordinadores de las cátedras de Control de Calidad de productos farmacéuticos y veterinarios I y Microbiología Aplicada III respectivamente, para que pueda ser consultado como material de apoyo en el ensayo de endotoxinas bacterianas y de esta manera estoy contribuyendo a la formación académica de los estudiantes de la facultad de Química y Farmacia, de la Universidad de El Salvador.

En espera que dicho material sea utilizado por los estudiantes de la asignatura.

Atentamente.


Br. Claudia Beatriz Osorio Colindres


Eliseo Ayala.
19-8-11
Recibido.

Ciudad Universitaria, Agosto de 2011

MSC. Norma Esthela Molina Velásquez
Coordinadora de la asignatura
Microbiología Aplicada III
Presente

Estimada Maestra Molina.

Reciba un cordial saludo esperando que todas sus actividades se estén realizando de la mejor manera posible.

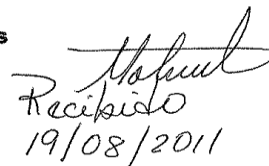
El motivo de la presente es para hacerle entrega de tres ejemplares del: **Manual de Procedimiento de Validación de la Prueba de Endotoxina Bacteriana (LAL) por el Método Gel – Clot**. Como parte de cumplimiento del quinto objetivo del trabajo de graduación para optar al grado de licenciatura en química y farmacia, denominado: Validación de la prueba de endotoxina bacteriana (LAL) por el método Gel – Clot utilizando el producto Furosemida (20mg) inyectable; los cuales tienen que ser entregado a los coordinadores de las cátedras de Control de Calidad de productos farmacéuticos y veterinarios I y Microbiología Aplicada III respectivamente, para que pueda ser consultado como material de apoyo en el ensayo de endotoxinas bacterianas y de esta manera estoy contribuyendo a la formación académica de los estudiantes de la facultad de Química y Farmacia, de la Universidad de El Salvador.

En espera que dicho material sea utilizado por los estudiantes de la asignatura.

Atentamente.



Br. Claudia Beatriz Osorio Colindres



Recibido
19/08/2011