PYROGENS IN SMALL VOLUME PARENTERALS IN HOSPITAL PHARMACY

CARMEN LACASA DIAZ (FACULTY OF PHARMACY, NAVARRA UNIVERSITY).

Pyrogens tests methods in small volume parenterals (water for injection, sodium chloride 0.9% and sodium bicarbonate 8.4%), in hospital pharmacy have been evaluated: rabbit test, bacteriological assay prior the sterilization and Limulus amoebocyte lysate test (LAL) (the clot endpoint and the chromogenic substrate methods).

The results of three standard lots manufactured were rabbits negative, have had low bacterial counts prior sterilization and endotoxin contents minor off 25 pg/mL with LAL method. Also, the same solutions were contaminated with differents counts of E. coli and then sterilized; the results in water for injection by bacterial counts and LAL methods were agree with the rabbit method. The same was observed in sodium chloride injection, except no valid LAL clot gelpoint test. In sodium bicarbonate were no valid the LAL and microbiological tests. The environmental endotoxins produced less hyperthermia in rabbits that standard endotoxins, at the same content in EU/mL. Platelets aggregation in whole blood was produced by endotoxin but with higher contents that pyrogenic doses.

Revisado el impreso E y el resumen en inglés, los encuentro conformes.

Prof. Dr. Felix Alvarez de la Vega

INTRODUCCION

El estudio de los pirógenos se remonta a los comienzos del siglo XX al incrementarse las reacciones febriles severas con el aumento de la administracion intravenosa (Personeus, 1973). Actualmente se acepta que los pirógenos exógenos son principalmente endotoxinas, complejos de lipopolisacaridos (LPS) y proteinas de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Morrison et al, 1985).



El LPS tiene un componente llamado lípido A que es el responsable de la acción pirogénica. Recientemente, Rietschel et al (1985) han atribuido a los radicales R3 aciloxacil con enlace amida del lípido A, la acción pirogénica; ya que los lípidos A, potentes pirógenos, de algunas bacterias (Xanthomonas sinensis y Chromobacterium violaceum), poseen estos radicales.



En la preparación de las formas farmacéuticas parenterales, es preciso extremar las buenas practicas de fabricación para evitar la contaminación pirogénica. Los análisis de pirógenos se han realizado en diferentes modelos "in vivo", conejos (farmacopeas), embriones de pollo, ratones y ratas, etc. En 1956 Levin y Bang unieron "in vitro" el lisado de amebocitos de Limulus (LAL) y un extracto de endotoxina bacteriana,

observando que formaba un gel. Este método fué utilizado por Cooper et al (1971) para detectar piúrogenos en muestras problema.

En los Servicios de Farmacia de Hospital se necesita un método sencillo y rápido de control de pirógenos en los inyectables de propia fabricacion y en productos de la industria farmacéutica que han dado reacciones pirogénicas en pacientes. El método clásico en conejos precisa condiciones difíciles de mantener en una farmacia de hospital.

Como objetivo nos hemos propuesto encontrar un método práctico para control de pirógenos en la fabricación de inyectables de de pequeño volumen en farmacia de hospital y mejorar las técnicas de preparación de estos inyectables. Para ello nos hemos basado en los tres puntos siguientes:

1. Analizar tres lotes de ampollas de 10 mL, agua para inyección cloruro sódico 0.9% y bicarbonato sódico 8.4%, mediante los métodos de hipertermia en conejos, LAL y microbiológico anterior a la esterilización. Analizar tres lotes de las mismas soluciones contaminadas previamente con recuentos conocidos de E. coli y después esterilizadas por los tres métodos citados.

2. Estudiar la correlación de estos métodos para deducir la posibilidad de evitar el control en conejo.

3. Comprobar el efecto de la endotoxina sobre la agregacion plaquetaria en PRP y sangre total como posible método alternativo.

METODOS → DIAPOSITIVA 3 | ESQUEMAS

→ " 4

- Inyectables no contaminados

Se prepararon tres lotes estandar de los inyectables citados y despues del llenado de las ampollas, se separaron muestras del principio y del final de los lotes que se filtraron a través de 0,45 µm. Se colocaron los filtros sobre placas de agar para recuento microbiológico. El resto de las ampollas se sometió a esterilización.

-Inyectables contaminados

Segun la técnica de Marcus (1964) se prepararon distintas diluciones de E. coli en las mismas soluciones, en concentraciones de 10.000, 1.000, 100 y 10 colonias/mL. Se tomaron muestras alícuotas de las diluciones que se filtraron, incubando después los filtros en placa de agar Mc Conkey para recuento. El resto se distribuyó en viales y ampollas que se

analizaron después de esterilizados por LAL y en conejos.

b. Métodos de valoración

DIAPOSITIVA 5. MÉTODOS
- RECUENTO
- LAL

1. Recuento microbiologico

Método Farmacopea Europea (1980) para detectar la presencia de formas viables de bacterias, hongos y levaduras. Se utilizaron medios de cultivo específicos.

2. Método LAL

- LAL Pyrogent

pH 6-7.5

Endotoxina E. coli 055:B5

Tubos. Inhibición, positivo, negativo y muestra.

- LAL "Coatest endotoxin" → ESQUEMA LAL

Endotoxina E. coli 0111:B4

Lectura en espectrofotómetro a 405 nm.

3. Análisis en conejos

USP XXI (1985)

10 mL/kg (agua para inyeccion y cloruro sódico 0.9%). 5 mL/kg (bicarbonato sódico 8.4%)

4. Agregación plaquetaria

Método de Born y Cross (1963) en plasma rico en plaquetas. Mide cambios en la transmision de luz.

Método de Cardinal y Flower (1980) en sangre total. Mide cambios de impedancia entre los electrodos del agregómetro.

DISCUSION

Las endotoxinas de las plantas de fabricación son menos pirogénicas en conejos que las endotoxinas estandar. Esto se observa si comparamos los resultados en inyectables contaminados y no contaminados (tablas 1 y 2). Concentraciones de hasta 25 pg/mL en cloruro sódico 0,9% sin contaminar son apirógenas en conejos; similares concentraciones en las soluciones contaminadas dan resultados positivos en conejos.

Los resultados por los tres métodos en los inyectables no contaminados son concordantes. En las soluciones contaminadas hay correlación en agua para inyección; también en cloruro sódico 0,9% con la excepción del método LAL "Pyrogent" que no fué válido para esta solución (tabla 3). En bicarbonato sódico

8,4% no se han mostrado validos el método LAL y el recuento bacteriano.

La inhibición en bicarbonato sódico 8.4%, realizando el estudio con endotoxina estandar, se evita en alguna medida ajustando el pH y diluyendo 1/10 las muestras (tabla 4). Sin embargo en el bicarbonato sódico 8,4% contaminado con E. coli hospitalario, aún diluyendo la muestra 1/10 y ajustando el pH, los resultados fueron negativos por LAL y positivos en conejos, lo cual indica que no se evitó la inhibición por la dilución y por tanto el método LAL no es adecuado en esta solución. Se sugiere que el pH elevado y la temperatura de esterilización han podido producir cambios en la estructura del LPS de E. coli que lo hacen más pirogénico en conejos.

Se obtuvo efecto agregante de la endotoxina en sangre total aunque en concentraciones mucho mayores que las dosis pirogénicas.

METODOS

- Preparación de las muestras
  Soluciones contaminadas. Método de Marcus (1964)

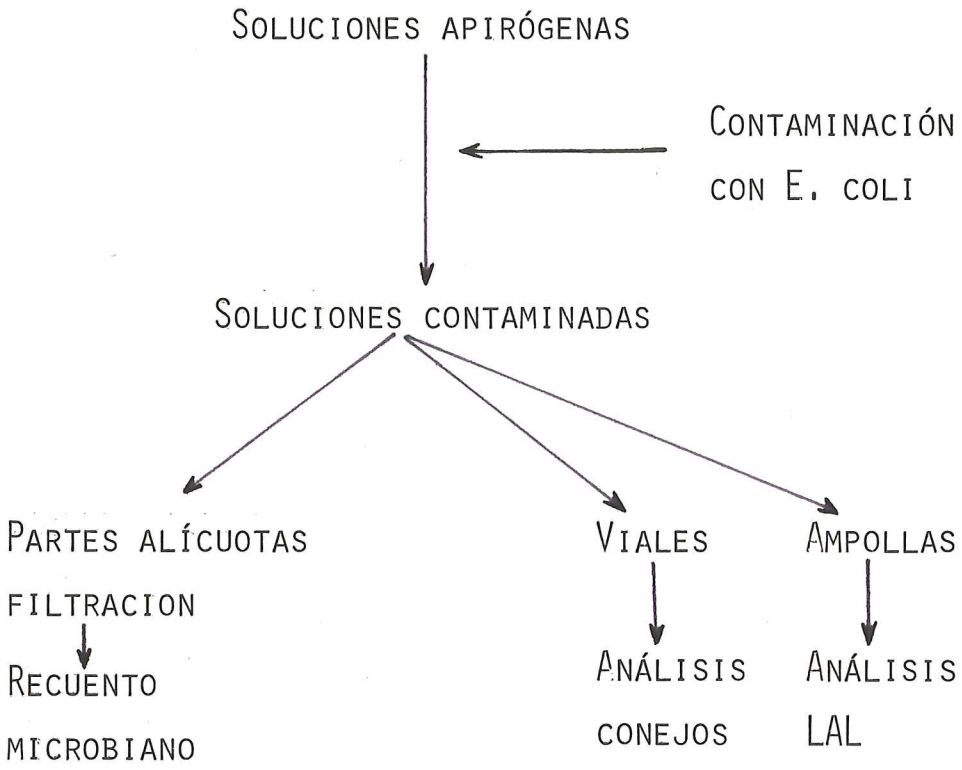
- Recuento microbiano
  Farmacopea Europea (1980)

- Lisado de amebocitos de Limulus (LAL)
  LAL Pyrogent (gel firme- no gel)
  LAL Coatest endotoxin (sustrato cromogénico)

- Análisis en conejos
  USP XXI (1985)

- Agregación plaquetaria
  Método de Born y Cross (1963) en PRP
  Método de Cardinal y Flower (1980) en sangre total

SOLUCIONES CONTAMINADAS



INYECTABLES NO CONTAMINADOS

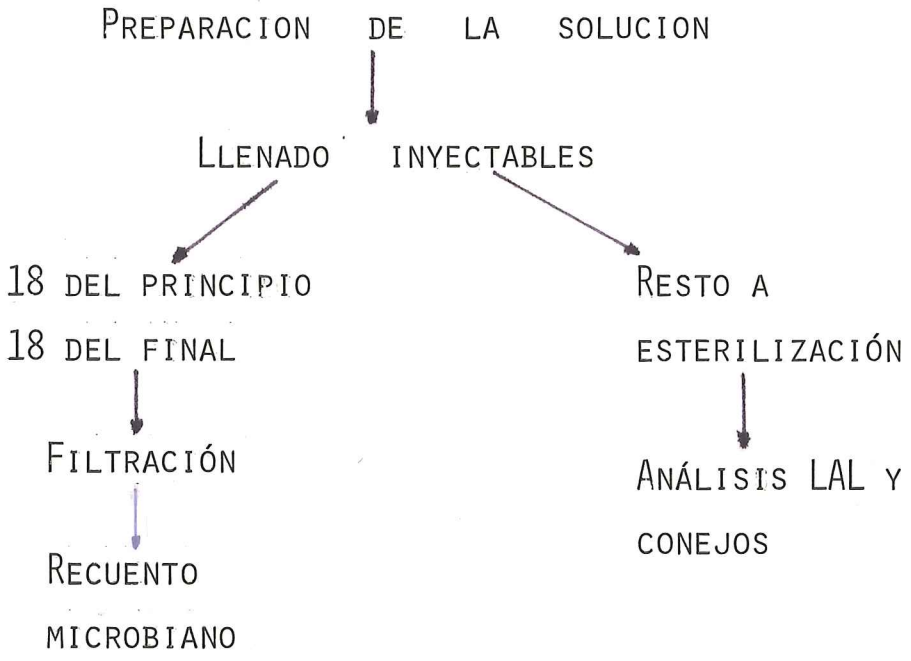


TABLA 1. RESULTADOS EN INYECTABLES NO CONTAMINADOS

	$\bar{x}$, GERMENES/mL		LAL		CONEJOS
	P	F	PYROGENT	COATEST	
AGUA PARA INYECCION	6,3	1,4	NEG	<12,5 (11) 16,9	NEG
CLORURO SÓDICO 0,9%	43,2	3,2	NEG	<12,5 (8) 14,3 16,2 18,7 25	NEG
BICARBONATO SÓDICO 8,4%	0	0	NEG	<12,5 (12)	NEG
N	6	6	4	12	9

TABLA 2. RESULTADOS EN LAS SOLUCIONES PREVIAMENTE CONTAMINADAS CON E. COLI

	No DE GERMENES/mL		LAL		CONEJOS
	TEORICOS	VIABLES	PYROGENT	COATEST pg/mL	
AGUA PARA INYECCION	10.000	15	++	26,2	+
	1.000	8	+	25,2	-
	100	1	-	19,3	-
	10	0	-	14,1	-
CLORURO SODICO 0,9%	10.000	5.187	+	43.200*	+
	1.000	484	+	2.530*	+
	100	50	-	418*	+
	10	4	-	25,2	+
BICARBONATO SODICO 8,4%	10.000	6	-	<12,5	+
	1.000	2	-	<12,5	+
	100	0	-	<12,5	+
	10	0	-	<12,5	+

* estimadas por extrapolación

TABLA 3. GELIFICACIÓN DEL LAL PYROGENT EN CLORURO SÓDICO 0,9% CONTAMINADO

CONTAMINACION	GERMENES/mL	UE/mL	pH	
			5,5	7
ENDOTOXINA		1	+++	+++
E. COLI 055 B5		0,5	++	+++
E. COLI	10.000	540	+	++
	1.000	31,7	+	+
	100	5,2	-	-
	10	0,3	-	-

TABLA 5. EFECTO DE LA ENDOTOXINA EN LA AGREGACION PLAQUETARIA EN SANGRE TOTAL EXPRESADA EN %.

MUESTRA	ENDOTOXINA EN µG		
	2,5	12,5	25
A	28	37	93
B	0	0	48
C	0	10	25