COPIA 2

NOTA: LAS Palabras subrayadas en trazos, deben ir en negrilla.

PIROGENOS EN INYECTABLES DE ANESTESICOS LOCALES DE ADMINISTRACION ESPINAL, PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

A. AGUIRREZABAL ×△, C. ALONSO-VILLAVERDE ℑ, C. LACASA □, F. ALVAREZ DE LA VEGA ▲.

× Servicio de Farmacia, Hospital de Basurto, Bilbao, España; ℑ Departamento de Patología Experimental del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona; □ Hospital de Barcelona, Barcelona, España; ▲ Universidad de Navarra, Pamplona, España.

△ Autor al que debe dirigirse la correspondencia: Dra. Ana Aguirrezabal, Servicio de Farmacia, Hospital de Basurto, c/ Avda. Montevideo 18, 48013 Bilbao, España.

PIROGENOS EN INYECTABLES DE ANESTESICOS LOCALES DE ADMINISTRACION ESPINAL, PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

A. AGUIRREZABAL[× △], C. ALONSO-VILLAVERDE [ℑ], C. LACASA [□], F. ALVAREZ DE LA VEGA [▲].

× Servicio de Farmacia, Hospital de Basurto, Bilbao, España; ℑ Departamento de Patología Experimental del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona; □ Hospital de Barcelona, Barcelona, España; ▲ Universidad de Navarra, Pamplona, España.

RESUMEN: Se analizaron cinco lotes de inyectables (bupivacaína.ClH 0,5%, bupivacaína.ClH 0,5% con glucosa 8%, lidocaína.ClH 5%, lidocaína.ClH 5% con glucosa 7,5% y glucosa 8%) mediante los métodos de recuento microbiológico anterior a la esterilización, conejos y lisado de amebocitos de Limulus (LAL) (gelificación y substrato cromogénico). También se analizaron lotes de las mismas soluciones contaminadas con Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa, después de su esterilización, por los tres métodos citados. El método LAL se mostró eficaz en bupivacaína.ClH 0,5% con o sin glucosa 8% y en lidocaína.ClH 5% con o sin glucosa 7,5% tras diluirse 1/10 y 1/20 respectivamente. En glucosa 8% se confirmó que el aumento del tiempo de hidrólisis enzimática en el LAL "Coatest endotoxin" a seis minutos aumenta la

sensibilidad del ensayo, siendo màs apropiado que el LAL "Pyrogent" para la detecciòn de bajas concentraciones de endotoxina. Se necesitaron en los cuatro lotes de soluciones de anestèsicos contaminados concentraciones 10 a 100 veces mayores de gèrmenes/ml para obtener un resultado positivo en conejos en comparaciòn al anàlisis LAL. El mètodo de conejos no resultò apropiado para la detecciòn de pirògenos en estos inyectables.

INTRODUCCION

Se han descrito durante 1986 y 1990 diversos casos de meningitis asèptica tras anestesias espinales con bupivacaina.ClH 0,5% con glucosa 8%, llevadas a cabo bajo estrictas condiciones de asepsia (1 - 4).

El mètodo universal de anàlisis de pirògenos en inyectables es el de conejos; aunque en algunos medicamentos puede ser dificil o imposible valorarlos, a causa de su efecto hipotèrmico enmascarante (5). En los anestèsicos locales su toxicidad es otro factor limitante y deben ser diluidos (6, 7).

En España algunas especialidades de anestèsicos locales de administraciòn espinal carecen de registro farmacèutico, distribuyèndose como fòrmulas magistrales.

El objeto de este trabajo es elegir, entre los mètodos de recuento microbiològico anterior a la esterilizaciòn, conejos y LAL (gelificaciòn y substrato cromogènico), el mètodo màs idòneo para el control de pirògenos en

inyectables espinales de anestésicos locales: bupivacaína.ClH 0,5%, bupivacaína.ClH 0,5% con glucosa 8%, lidocaína.ClH 5% y lidocaína.ClH 5% con glucosa 7,5%.

Para ello se comparan los resultados obtenidos mediante los métodos citados en estos inyectables y en un lote de inyectables de glucosa 8%, y sobre las mismas soluciones contaminadas previamente con recuentos conocidos de Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa, después de esterilizadas.

MATERIAL Y METODOS

Aparatos

El equipo incluye: máquina llenadora y cerradora de ampollas Macorra Autofarma 2500; autoclave Labora-Adsuar; aparato esterilizador por óxido de etileno 3M Indos 402B; estufa calor seco con circulación por aire forzado Selecta S-140D; aparatos de filtración a vacío Sartorius SM-16551E con filtro y Millipore XX10 047 00; aparato de filtración a presión Sartorius SM-16275; centrífuga Heraus Sepatech Medifuge; estufas de incubación a 37°C Memmert BW50; microscopio Nikon Labophot; hemocitómetro Burker 0,0025 mm; cámara de anaerobiosis Gaspack BBL 60626; pHmetro Crison digital 501; agitador vibrador para tubos Heidolph 54111; espectofotómetro Atom 334 y aparato registrador de temperatura termoeléctrico Ellab, tipo APT

75.

Todos los materiales eran desechables, estériles y apirógenos. Se utilizaron tubos de vidrio para la preparación de los controles y muestras del análisis LAL.

Reactivos

Medios de cultivo: caldo de Mueller-Hinton Difco y agar sangre con triptona y soja Oxoid, para gérmenes aerobios; Tioglicolato Difco y agar Brucella Oxoid, para gérmenes anaerobios; medio Sabouraud agar modificado Difco y caldo Mueller-Hinton Difco, para hongos y levaduras.

LAL: reactivo "Pyrogent" (lote 9L0925, Whittaker M.A. Bioproducts Inc., Walkersville, MD) y "Coatest endotoxin" (lote 88275-51, Kabi Vitrum, Mölndal, Sweden).

Endotoxinas: endotoxina E. coli 055:B5, 10 UE/ng (lote 8L1330, Whitakker Bioproducts Inc., Walkersville, MD); endotoxina E. coli 011:B4 (lote 28626-51, Kabi Vitrum, Molndal, Sweden); y cepas hospitalarias de E. coli y P. aeruginosa del laboratorio de Microbiología, Hospital de Basurto, Bilbao, España.

Animales

Conejos raza albina Nueva Zelanda de 2-4 kg de peso.

Preparación de las muestras

Inyectables: Se prepararon cinco lotes de referencia con ampollas de 10 ml de bupivacaína.ClH 0,5%, bupivacaína.ClH 0,5% con glucosa 8%, glucosa 8%, lidocaína.ClH 5% y lidocaína.ClH 5% con glucosa 7,5%. Todo el material de vidrio y metal que estuvo en contacto con la solución se hizo estéril y apirógeno mediante tratamiento a 250°C durante 30 minutos (8)(USP XXII/ NF XVII, p. 1515); el material de goma y plástico se sometió a esterilización por óxido de etileno (0,9 g/l) a 63 °C, 170 minutos, con humedad relativa del 40-50% (9). Los controles realizados mediante el ensayo LAL, fueron negativos en todos los casos. Las soluciones se filtraron a través de membrana de 0,22 µm de poro y se llenaron y cerraron las ampollas. Se separaron 18 muestras del principio y 18 del final del lote para recuento microbiológico. El resto fueron autoclavadas a 121°C, durante 15 minutos (10).

Soluciones contaminadas: En las mismas cinco soluciones se prepararon diluciones de E. coli y de P. aeruginosa de 10 a 10.000.000 gérmenes/ml, siguiendo la técnica de Marcus (11). Se tomaron muestras de las diluciones que fueron filtradas a través de membrana de 0,45 µm. El resto se distribuyó en ampollas y se esterilizó, para el análisis por los métodos LAL y conejos.

Recuento microbiológico

Método de la Farmacopea Europea (12): Se emplearon los medios de cultivo antes descritos para detectar la presencia de formas viables de bacterias, hongos y levaduras.

Inyectables: 5 ml de medio de cultivo específico y 10 ml de cada muestra se filtraron a través de membrana de 0,45 µm. Para aerobios y anaerobios las lecturas de los filtros se realizaron hasta los 14 días de incubación a 37°C; las de hongos y levaduras hasta los 30 días, con la mitad de las muestras incubadas a temperatura ambiente y la otra mitad a 37°C.

Soluciones contaminadas: De cada una de las diluciones de E. coli y de P.aeruginosa preparadas en las soluciones de referencia se tomaron cuatro muestras de 0,1 ml para cada dilución de 10.000 gérmenes/ml y seis muestras de 1 ml para cada una de las diluciones de 1.000, 100 y 10 gérmenes/ml. Se filtraban como se ha indicado, después de 15, 60, 120 y 180 minutos de contacto en cada solución, debido al poder inhibidor de los anestésicos locales recogido por algunos autores (13-15), para ver si había diferencias en los recuentos en relación al tiempo. Los filtros se colocaban sobre placa de agar sangre a 37°C, durante 24 horas.

Análisis estadístico: Se realizó primero la transformación logarítmica de los recuentos microbiológicos y luego se aplicaron, en los inyectables, los test t de comparación de medias, y en las soluciones contaminadas, el análisis de la varianza de la regresión,

estableciéndose la significación de los parámetros que definen la relación entre el logaritmo del número de gérmenes/ml y el tiempo.

Método LAL

Es necesario un estricto cumplimiento de todo el procedimiento (16), conociendo las variables que pueden interferir en los resultados del análisis LAL y comprobar previamente la ausencia de inhibición (17-19). Cuando los productos inhibían la reacción LAL se comprobó si ajustando el pH de las muestras o diluyéndolas con agua, sin sobrepasar la máxima dilución válida (MDV) se evitaba la inhibición (USP XXII/ NF XVII, p.1494).

LAL "Pyrogent": Da lecturas de gel firme-no gel. Se distinguieron tres grados de positividad (+ = aumento ligero de viscosidad, ++ = aumento notable de viscosidad, +++ = gel firme) de acuerdo con las conclusiones de otros trabajos previos (20, 21). En las muestras de glucosa 8% (pH = 3,7) se ajustó el pH a 8,2, añadiendo un 10 % de solución reguladora de tris-hidroximetil-aminometano 0.05 N (10 µl por cada 100 µl de muestra).

LAL "Coatest endotoxin": Las rectas de calibrado se realizaron con concentraciones de endotoxina de 0'15, 0'30, 0'60, 0'90 y 1'2 UE/ml. Los resultados se leyeron a 405 nm.

En las muestras de glucosa 8% se estudió la inhibición tras añadir 2,5% y 10% de tris-hidroximetil-aminometano

0,05 M; los pH resultantes fueron de 7,5 y 8,2. En las de lidocaína.ClH 5% (pH = 4,6) y lidocaína.ClH 5% con glucosa 7,5% (pH = 4) con 10% de la misma solución reguladora; los pH resultantes fueron de 6,3 y 6,2. En las muestras de bupivacaína.ClH 0,5% (pH = 5,2) y de bupivacaína.ClH 0,5% con glucosa 8% (pH = 3,9) se produjo precipitado al ajustar el pH. Según indica el fabricante, el aumento de los tiempos de incubación y de hidrólisis puede aumentar la sensibilidad de la reacción.

Análisis en conejos.

Método USP XXII/NF XVII(8): Las dosis inyectadas fueron de 10 ml/kg (800 mg/kg) para la glucosa 8%; 0,2 ml/kg y 0,5 ml/kg (1 y 2,5 mg/kg) con la bupivacaína.ClH (7, 22) y de 0,1 ml/kg (5 mg/kg) con la lidocaína.ClH (7).

RESULTADOS

En la tabla I se indican los resultados del estudio de inhibición del LAL. Las rectas de calibrado para el LAL "Coatest endotoxin", con el procedimiento elegido para evitar la inhibición fueron (16): Bupivacaína.ClH 0,05%: $y = 107,25 + 1021,98 x$ ($r = 0,994$, $Sa = 19,07$, $Sb = 25,84$); bupivacaína.ClH 0,05% con glucosa 0,8%: $y = 48,89 + 988,04 x$ ($r = 0,989$, $Sa = 25,77$, $Sb = 34,92$); glucosa 8%: $y = -107,60 + 1720,11 x$ ($r = 0,997$, $Sa = 29,31$, $Sb = 39,71$); lidocaína.ClH 0,25%: $y = 99,65 + 865,15 x$ ($r =$

0,985, Sa = 26,68, Sb = 36,15); lidocaína.ClH 0,25% con glucosa 0,375%: y = 101,41 + 853,80 x (r = 0,984, Sa = 26,59, Sb = 36,03).

La tabla II muestra los resultados obtenidos mediante los tres mètodos en los inyectables. En la tabla III se indican los recuentos obtenidos en las soluciones con 10.000 colonias/ml de E. coli y de P. aeruginosa a los 15, 60, 120 y 180 minutos de contacto. En las tablas IV y V se observan los resultados obtenidos por LAL y conejos en las soluciones contaminadas.

DISCUSION

Estudio de inhibiciòn del LAL.

En las muestras de bupivacaína.ClH y lidocaína.ClH, las diluciones 1/10 y 1/20 respectivamente, evitaron la inhibiciòn en ambos mètodos LAL (tabla I), que no era eliminada con diluciones menores ni con el ajuste de pH ensayado (16). La diluciòn 1/10 de la glucosa 8% tambièn evitaba la inhibiciòn, pero es mayor de la MDV (22). Cuando se aÑadiò un 10% de soluciòn reguladora de pH, la sensibilidad obtenida en el LAL "Pyrogent" fuè semejante a la del agua, mientras que la inhibiciòn en el LAL cromogènico con diez minutos de incubaciòn y tres minutos de hidròlisis enzimàtica fuè del 32%, disminuyendo al 18,5% al aumentar el tiempo de hidròlisis a seis minutos,

lo que confirma las afirmaciones de Weary et al. (23), que atribuyen las diferencias en estos porcentajes con la velocidad de hidrólisis enzimática o con el estado de agregación de la endotoxina, factores que no influyen en LAL "Pyrogent".

Inyectables

Los resultados obtenidos con los tres métodos en todas las muestras analizadas (tabla II) coinciden. Los recuentos microbianos fueron mucho menores que el límite establecido por la USP XXII/NF XVII en el agua utilizada para la fabricación de inyectables (los gérmenes aerobios identificados fueron Pseudomonas maltophilia, un bacilo gram-negativo no fermentador y especies de Micrococcus). Después de la esterilización se obtuvo ausencia de gel en todas las muestras en el LAL "Pyrogent", concentraciones de endotoxina menores de 0,15 UE/ml en el LAL "Coatest endotoxin" y resultados negativos en conejos.

Soluciones contaminadas

Los recuentos de P. aeruginosa en función del tiempo (tabla III) disminuyeron significativamente en la lidocaína.ClH 5% con glucosa 7,5% ($p << 0,0001$), lo que no ocurrió en el resto de las soluciones.

En las muestras de glucosa 8% contaminadas con E. coli (tabla IV), después de añadir un 10% de regulador de pH

(pH = 8,2), sólo la solución con 10.000.000 gérmenes/ml dió un resultado positivo en el LAL "Pyrogent". Con el LAL "Coatest" se detectaron concentraciones de endotoxina de 0,16 UE/ml en los dos tercios de las muestras con 10.000 colonias/ml. También los resultados obtenidos en las soluciones de glucosa 8% contaminadas con P. aeruginosa (tabla V) corroboraron que el LAL cromogénico es más apropiado para la glucosa 8% que el de gelificación. Esto confirma que el método LAL "Pyrogent" se interpreta de forma más subjetiva que el método cromogénico (24).

En conejos, se obtuvieron resultados positivos, con la dilución de 1.000.000 colonias/ml de E. coli (tabla IV), lo que supone según los resultados del LAL "Coatest" inyectar 2,3 UE/kg, que es más bajo que el límite de endotoxina establecido por la FDA (22) por vía intravenosa. Fauli et al. (25) comunicaron que inyectando a distintas ternas de conejos dosis de endotoxina de E. coli 055:B5 de 1,5 UE/kg y de 2,5 UE/kg los conejos que mostraban un incremento de temperatura corporal superior a 0,55°C eran el 15% y 17% del total respectivamente, lo que explica los resultados obtenidos en la solución contaminada con 1.000.000 gérmenes/ml de E. coli por LAL "Coatest" y conejos, pero no los del LAL "Pyrogent".

En las soluciones de bupivacaína.ClH 0,5% con o sin glucosa 8% contaminadas con E. coli (tabla IV), no se han detectado pirógenos por los métodos de LAL y de conejo.

En las soluciones de lidocaína.ClH contaminadas con E. coli (tabla IV) y en las cuatro soluciones de anestésicos contaminadas con P. aeruginosa (tabla V) se necesitaron concentraciones de gérmenes 10 a 100 veces mayores en conejos que en el análisis LAL, para obtener un resultado positivo, lo que confirma que el test LAL da un mayor margen de seguridad que el análisis en conejos.

Los conejos toleraron bien dosis de 2,5 mg/kg de bupivacaína.ClH. Esta es la dosis máxima humana que indica la FDA (22) como guía; sin embargo otros autores han tenido problemas al administrarla, recomendando dosis de 1 mg/kg (7). Es necesario señalar que la mitad de los conejos inyectados con esta dosis experimentaron después de la inyección, espasmos y dificultad respiratoria, normalizándose posteriormente. Este efecto fué observado independientemente de que el resultado final fuese positivo o negativo para los pirógenos. Además en 5 de los 22 conejos se apreció una caída de su temperatura corporal, que pudiera ser debida también a la dosis de bupivacaína.ClH. Un conejo al que se le administró 5 mg/kg de bupivacaína.ClH murió. Todos los conejos toleraron la dosis de 5 mg/kg de lidocaína.ClH (7). La FDA indica una dosis máxima humana de 4,5 mg/kg (22).

Los límites de endotoxina establecidos por la FDA en 1983 son de 5 y 0,2 UE/kg para las vías intravenosa y espinal, respectivamente. Si tenemos en cuenta que en los inyectables de bupivacaína.ClH 0,5% con o sin glucosa 8% el límite permitido de endotoxina es de 3,11 UE/ml, de

acuerdo a la dosis màxima del anestèsico por vìa espinal (22,5 mg de bupivacaìna.ClH = 4,5 ml de estos inyectables)(10), una soluciòn asì contaminada administrada al conejo a dosis de 2,5 mg/kg supondrìa inyectarle 1,555 UE/kg, que serìa negativa en la mayorìa de los conejos. Los resultados de un trabajo anterior (1) confirman èsto, ya que un lote de bupivacaìna.ClH 0,5% con glucosa 8% que produjo once casos de meningitis asèptica diò negativo en conejos, mientras que se obtuvieron resultados de gel firme en el LAL "Pyrogent", cuando se diluyò 50 veces la la muestra. Para los inyectables de lidocaìna.ClH 5% con o sin glucosa 7,5% el lìmite permitido por vìa espinal es de 7 UE/ml (100 mg de lidocaìna.ClH = 2 ml)(10), que debido al lìmite de dosis supone administrar al conejo, vìa intravenosa, 0,7 UE/kg, que serìa claramente negativo.

La sensibilidad del ensayo en conejos està directamente relacionada con el volumen inyectado por kg de peso, mientras que el anàlisis LAL no està relacionado con el volumen (26). La inyecciòn en el conejo de volùmenes importantes (10 ml/kg) permite la detecciòn de endotoxina con el mismo nivel de sensibilidad del ensayo LAL; no siendo posible en las preparaciones de anestèsicos locales que no pueden ser inyectados màs que en volùmenes pequeños (de 0,5 ml/kg o menos), por razones de toxicidad.

CONCLUSIONES

El anàlisis microbiològico anterior a la esterilizaciòn en inyectables de anestèsicos locales puede ser interesante para el control en proceso, aunque un resultado de bajo recuento no es indicativo de ausencia de pirògenos, particularmente en lidocaìna.ClH 5% con glucosa 7,5%.

El mètodo LAL se ha mostrado eficaz en bupivacaìna.ClH 0,5% y en bupivacaìna.ClH 0,5% con glucosa 8% tras diluirse 1/10 y en lidocaìna.ClH 5% con o sin glucosa 7,5% tras diluirse 1/20.

En glucosa 8%, el LAL "Coatest endotoxin" ha resultado màs apropiado que el LAL "Pyrogent" para la detecciòn de bajas concentraciones de endotoxina. Tambièn se ha confirmado en glucosa 8% con un 10% de soluciòn reguladora de pH, que un aumento del tiempo de hidròlisis enzimàtica en el LAL "Coatest endotoxin" a seis minutos, supone un aumento de la sensibilidad del LAL, lo que puede ser interesante de aplicar en otros productos.

En las soluciones contaminadas con P. aeruginosa se necesitò una concentraciòn de gèrmenes 100 veces mayor para obtener una respuesta positiva en conejos, en comparaciòn al anàlisis LAL, lo que confirma que el test LAL da un mayor margen de seguridad que el anàlisis en conejos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Departamento de Sanidad y Consumo del Gobierno Vasco, por la concesión de una beca para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguirrezabal, A.V., Alvarez, M., Boada, T., De Miguel, R., Iribarren, M., Sanz, A., Vilella, M.L., Yurrebaso, M.J., Lacasa, C., "Detección de endotoxina en inyectables por vía espinal". XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacéuticos de Hospitales, Zaragoza (España) 1986.
2. Arteta, M., Martinez-Bourio, R., Saez de Eguilaz, J.L., Aguilera, L., Nieva, R., "Meningitis química como complicación tras anestesia intradural," III Symposium Internacional de Anestesia, Pamplona (España) 1986.
3. Martinez Bengoechea, M.J., Aguilera, L., Seoane, A., Arteta, M., Martinez Bourio, R., Rodriguez Sasiain, J.M., "Peligro de las fórmulas magistrales para administración intradural," XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacéuticos de Hospitales, Zaragoza (España) 1986.
4. Silio, F., Comunicación del Servicio Vasco de Salud Osakidetza (España) 1990.
5. Personeus, G.R., "Pyrogen testing of parenteral pharmaceuticals," En Cooper M.S., Ed, "Quality Control in the Pharmaceutical Industry," Academic Press, Inc.; New York, 1973, pp. 239-268.
6. Akers, M.J., "Pyrogen testing. Interferences of the rabbit pyrogen test," En Robinson J.R., (Ed), "Parenteral Quality Control, Sterility, Pyrogen, Particulate, and Package Integrity Testing", Marcel Dekker, Inc.; New York, 1985, p. 97.
7. Rodriguez, E., Comunicación personal, 1988
8. United States Pharmacopoeia XXII/National Formulary XVII, The USP Convention, Inc.; Rockville, MD, 1990.
9. Hansen, E.W., Pedersen M.R., "Inactivation of E. coli endotoxin after ethylene oxide sterilization," 18 European Symposium on Clinical Pharmacy, 1989.

10. American Hospital Formulary Service, McEvoy, G.K., (Ed.), American Society of Hospital Pharmacists, Inc.; Bethesda, 1991, p. 1952.
11. Marcus, S., "Determination of Pyrogens Using Membrane Filtration," Meeting of the Parenteral Drug Association. Philadelphia, 1964.
12. European Pharmacopoeia, 2nd ed., V.2.1.9, Part. II, Paris, 1987.
13. Weinstein, M.P., Maderazo, E., Tilton, R., Maggini, G., Quintiliani, R., "Further observations on the antimicrobial effects of local anesthetic agents," Curr. Ther. Res., 17, 369-374 (1975).
14. Wimberley, N., Willey, S., Sullivan, N., Bartlett, J.S., "Antibacterial properties of lidocaine," Chest, 76, 37-40 (1979).
15. Miller, M.A., Shelley, W.B., "Antibacterial properties of lidocaine on bacteria isolated from dermal lesions," Arch. Dermatol., 121, 1157-1159 (1985).
16. Aguirrezabal, A.V., "Pirógenos en inyectables de anestésicos locales de administración espinal, preparados en Farmacia de Hospital," Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra (España), 1990.
17. McCullough, K.Z., "Variability in the LAL test," J. Parenter. Sci. Technol., 44, 19-21 (1990).
18. McCullough, K.Z., Weidner-Loeven, C., "Variability in the LAL test: Comparison of three kinetic methos for the testing of pharmaceuticals product," J. Parenter. Sci. Technol., 46, 69-72 (1992).
19. Cooper, J.F., "Resolving LAL test interferences," J. Parenter. Sci. Technol., 44, 13-15 (1990).
20. Levin, J., "The history of the development of the Limulus amebocyte lysate test," En ten Cate, J.W., Buller, H.R., Sturk, A., Levin, J., Eds., "Bacterial Endotoxins: Structure, Biomedical Significance, and Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test," Alan R. Liss Inc.; New York, 1985, pp. 3-28.
21. Lacasa,C., Vega F.A., "Pyrogens in small-volume parenterals prepared in Hospital Pharmacy," J. Parenter. Sci. Technol. 40, 246-249 (1989).
22. United States 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," 1987.
23. Weary, M., Dubzack, J., Wiggins, J., Bohon, J., Brandon, A., Pearson, F.C., "Validating an LAL chromogenic substrate pyrogen test for large volume parenterals," En ten Cate, J.W., Buller, H.R., Sturk, A., Levin, J., (Eds.), "Bacterial Endotoxins: Structure, Biomedical Significance, and Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test," Alan R. Liss, Inc.; New York, 1987, pp. 307-322.
24. Hochstein, H.D., "Quality control for LAL and endotoxin," En ten Cate, J.W. et al. (Eds.), Ref. 16 (1985), pp. 221-239.

25. Fauli, C., Margalet, A., Jane, J., "Validaciòn del ensayo LAL para control de pirògenos en soluciones parenterales," Farm. Clin., 3, 224-234 (1986).
26. Bruneau, J., Cohen, Y., Merlin, L., Peysson, S., "La recherche des endotoxines dans les préparations radiopharmaceutiques. II. Comparaison de la sensibilité des methodes utilisant le lapin et le lysat d' amoebocytes de Limule pour la détection d'endotoxines," Int. J. Nucl. Med. Biol., 12, 471-476 (1986).

TABLA I. Estudio de inhibición con LAL "Pyrogent" y con LAL "Coatest endotoxin"

Solución	Dilución	Solución reguladora pH añadida (µl)	Sensibilidad LAL "Pyrogent" UE/ml	% Inhibición LAL "Coatest endotoxin"	
Bupivacaína ClH 0,5% (pH = 5,2)	–	–	> 0,5	77,2	A
	*1/10	–	0,125	12,8	A
Bupivacaína ClH 0,5% + glucosa 8% (pH = 3,9)	–	–	> 0,5	100	A
	*1/10	–	0,125	24	A
Glucosa 8% (pH = 3,7)	–	–	0.287	76,2	B
	–	10	0,125	32	B
	–	*10	0,125	18,5	C
	–	2,5		59,7	C
	1/10	–	0,125	0	A
	1/10	–	0,125	< 3	B
Lidocaína ClH 5% (pH = 4,6)	–	–	> 0,5	100	A
	–	10		100	A
	1/5	–	> 0,5		
	1/10	–	0,379	> 50	A
	*1/20	–	0,189	27	A
	1/50	–	0,165		
Lidocaína ClH 5% + glucosa 7,5% (pH = 4)	–	–	> 0,50	100	A
	–	10		100	A
	1/5	–	> 0,50		
	1/10	–	> 0,50	> 50	A
	*1/20	–	0,189	28	A
	1/50	–	0,165		

LAL "Coatest", tiempos (min): incubación - hidrólisis

A	15	3
B	10	3
C	10	6

(*) Procedimiento elegido para análisis de las muestras

TABLA II. Resultados de los inyectables

Inyectable	Bacterias/ml		LAL		Conejos
	P	F	"Pyrogent"	"Coatest" (UE/ml)	USP XXII
Bupivacaina.ClH 0,5%	17	1	-	< 0,15	-
Bupivacaina.ClH 0,5% con glucosa 8%	0,28	0,02	-	< 0,15	-
Glucosa 8%	10	18	-	< 0,15	-
Lidocaina.ClH 5%	0,15	0,03	-	< 0,15	-
Lidocaina.ClH 5% con glucosa 7,5%	0	0	-	< 0,15	-
N	6	6	4	12	3 *9

P = Muestras del principio del lote.
F = Muestras del final del lote.
- = Negativo.
N = Número de ampollas analizadas por lote; (*) en el lote de glucosa 8% se necesitaron 9 ampollas (10 ml/kg).

TABLA III. Recuento medio de gèrmenes/ml en soluciones contaminadas con 10.000 colonias/ml de *E. coli* y de *P. aeruginosa*, a los 15, 60, 120 y 180 min.

Soluciòn contaminada		Gèrmenes viables ($\bar{x} \pm s$) tiempo (min)			
		15	60	120	180
Bupivacaìna ClH 0,5%	(E)	3630±258	3640±406	3930± 65	2050±523
	(P)	4580±251	3700±217	2900±223	2610±577
Bupivacaìna ClH 0,5% + glucosa 8%	(E)	3900±306	3910±279	3925±176	3200±331
	(P)	3930±980	3040±308	2400±322	2290±281
Glucosa 8%	(E)	5500±365	5010±365	4300±522	4100±471
	(P)	4340±369	4450±775	4600±434	3900±628
Lidocaìna ClH 5%	(E)	3600±388	3160±656	2295±614	1830±278
	(P)	2353±462	2940±703	2410±320	1800±259
Lidocaìna ClH 5% + glucosa 7,5%	(E)	3100±195	3500±685	2220±288	1930±177
	(P)	925±182	445±202	15± 6	0

(E) = *Escherichia coli*
(P) = *Pseudomonas aeruginosa*

TABLA IV. Resultados obtenidos en soluciones previamente contaminadas con *E. coli*

Solución	Bacterias/ml	LAL		Conejos
	Teórico	"Pyrogent"	"Coatest" (UE/ml)	USP XXII
Bupivacaína ClH 0,5%	10.000.000	–	–	–
Bupivacaína ClH 0,5% + glucosa 8%	10.000.000	–	–	–
Glucosa 8%	10.000	–	<0,15 a 0,16	–
	100.000	–	0,18	–
	1.000.000	–	0,23	+
	10.000.000	+++	1,21	+
Lidocaína ClH 5%	100.000	–	–	–
	1.000.000	+ ++	5,87	–
	10.000.000	+++	16,27	+
Lidocaína ClH 5% + glucosa 7,5%	100.000	–	–	–
	1.000.000	++	6	–
	10.000.000	+++	16,80	+

(*) Los resultados de LAL y conejos de los recuentos realizados no incluidos en la tabla fueron negativos

TABLA V. Resultados obtenidos en soluciones previamente contaminadas con *P. aeruginosa*

Solución	Bacterias/ml	LAL		Conejos
	Teórico	"Pyrogent"	"Coatest" (UE/ml)	USP XXII
Bupivacaína ClH 0,5%	100.000	+ -	<1,5 a 2	-
	1.000.000	+++	18,17	-
	10.000.000	+++	411,67	+
Bupivacaína ClH 0,5% + glucosa 8%	100.000	++ +++	3,43	-
	1.000.000	+++	29,25	-
	10.000.000	+++	305	+
Glucosa 8%	10.000	+++	0,46	-
	100.000	+++	6,8	+
	1.000.000	+++	17,1	+
	10.000.000	+++	205	+
Lidocaína ClH 5%	100.000	+ -	-	-
	1.000.000	++	19,80	-
	10.000.000	+++	268	+
Lidocaína ClH 5% + glucosa 7,5%	100.000	+	-	-
	1.000.000	+++	29,07	-
	10.000.000	+++	388	+

(*) Los resultados de LAL y conejos de los recuentos realizados no incluidos en la tabla fueron negativos