PIROGENOS, VALORACION DE METODOS DE ANALISIS EN FARMACIA DE HOSPITAL

C. Lacasa, A. Aguirrezabal, M. Alvarez, T. Boada, R. de Miguel, M. Iribarren, A. Sanz, M. L. Vilella y M. J. Yurrebaso

Hospital Civil de Bilbao.

INTRODUCCION

El estudio de los pirógenos se remonta a los comienzos del siglo XX al incrementarse las reacciones febriles asociadas con el aumento de la administración intravenosa (Personeus, 1973). Actualmente se acepta que los pirógenos exógenos son principalmente endotoxinas, complejos de lipolisacáridos (LPS) y proteínas de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Morrison et al., 1985) (Figuras 1 y 2).

El LPS tiene un componente llamado lípido A (Figura 3), que es el responsable de la acción pirogénica. Recientemente, Rietschel et al (1985) han atribuido a los radicales R^3 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 prácticas de

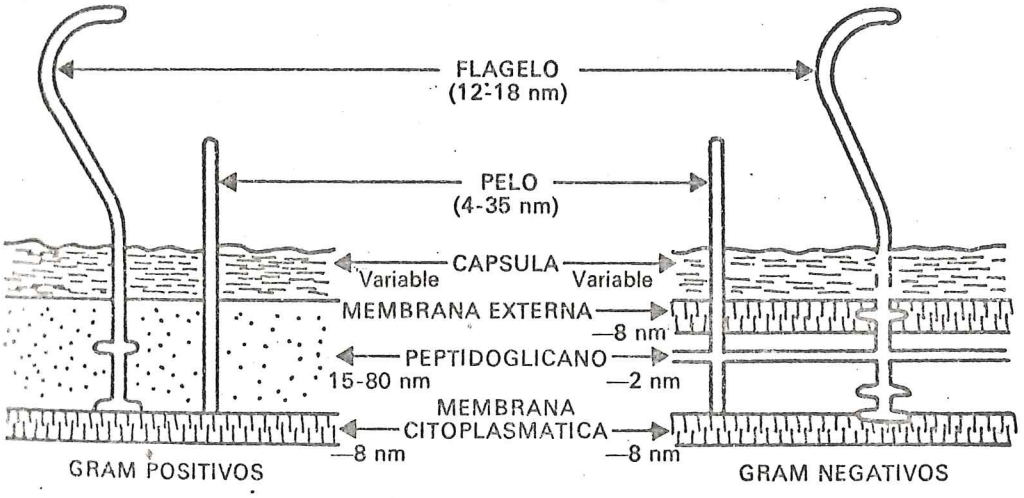


Fig. 1.—Compración de la estructura de las cubiertas de las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Ingraham et al., 1983).

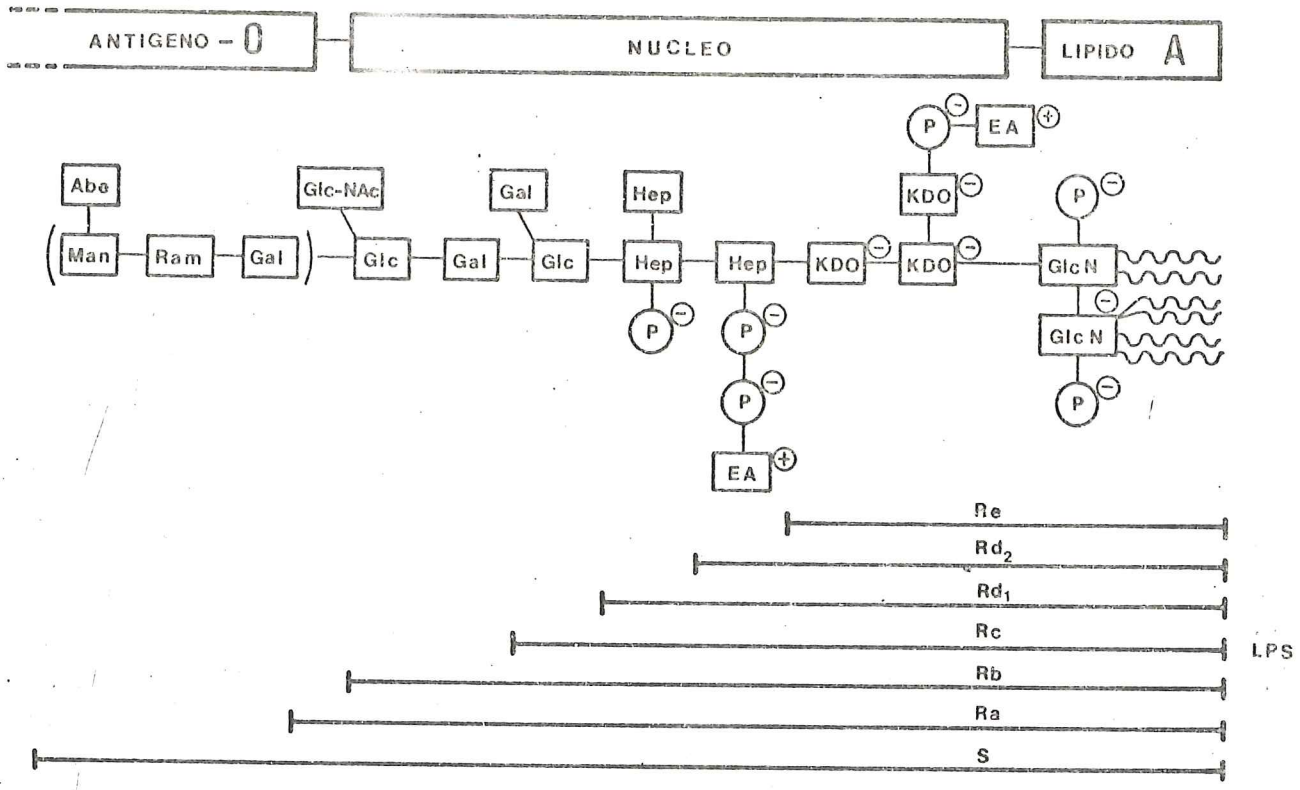


Fig. 2.—Representación esquemática de los varios LPS producidos por las cepas lisas (S) de *Salmonella typhimurium* y por varios mutantes rugosos (R) (Lugtenberg y Van Alphen, 1983, modificado). Man, manosa; Ramn, ramnosa; Gal, galactosa; Abe, abecuosa; Glc, glucosa; Hep, L-glicero-D-manoheptosa, KDO; ácido 2-ceto-3-deoxioctolusónico; GlcN, glucosamina; GlcNAc, N-acetil-D-glucosamina; EA, etanolamina.

fabricación para evitar la contaminación pirogénica. Los análisis de pirógenos se han realizado en diferen-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 fue utilizado por Cooper et al (1971) para detectar pirógenos 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 fabricación 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 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 por 100 y bicarbonato sódico 8,4 por 100, 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.

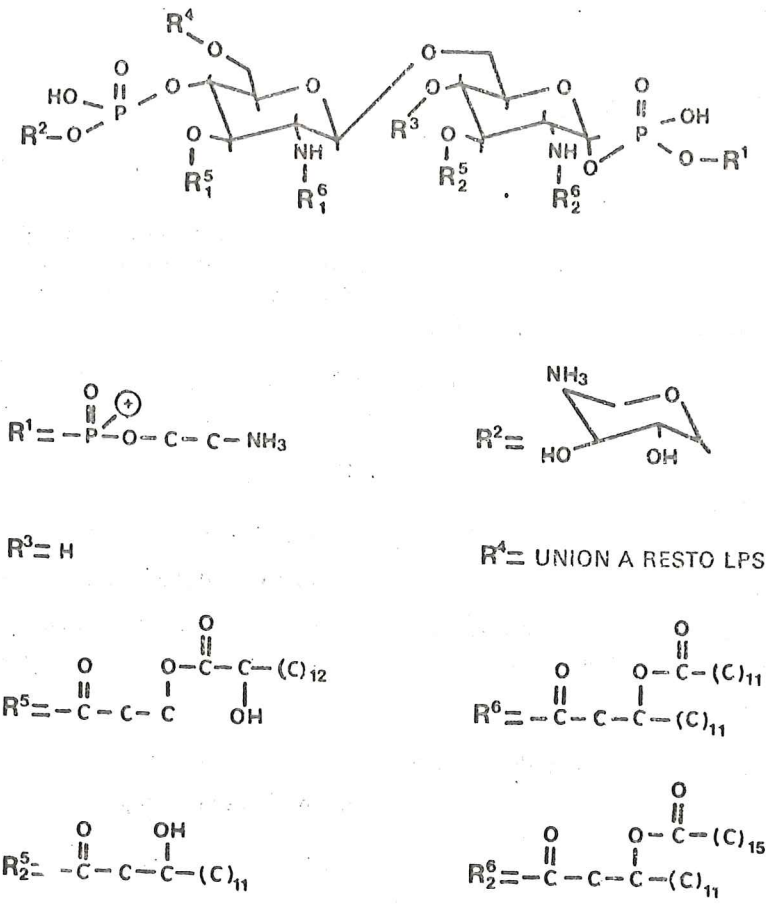


Fig. 3.—Estructura más frecuente del lípido A (modificada de Rietschel et al., 1984).

MATERIAL Y METODOS

A) Material

Aparatos

- Columna de intercambio iónico Dafa Mar 606.
- Aparato destilador de vidrio Vitrolab.
- Máquina llenadora y cerradora de ampollas Macorra Autofarma 2500.
- Autoclave Labora-Adsuar.
- Aparato esterilizador por óxido de etileno 3M Indos 402B.
- pHmetro Crison digital 501.
- Espectrofotómetro Atom 334.
- Baño de agua termorregulado Precis-TerA, Selecta S-141.
- Agitador vibrador para tubos Heidolph 54111.
- Estufa calor seco con circulación por aire forzado. Selecta S-140D.
- Estufas de incubación a 37 Memmert BW50.
- Aparato de filtración a vacío Sartorius SM-16551E con filtro.
- Aparato de filtración a presión Sartorius SM-16275.
- Cámara de anaerobiosis Gaspack BBL 60626.
- Microscopio Nikon Labophot.
- Aparato registrador de temperatura termoeléctrico Ellab.

Material desechable

— Jeringas de 1, 5 y 10 ml marca Ico.
— Placas de Petri de 90 mm de diámetro.
— Filtros Sartorius de 100 mm de diámetro y 0,22 micras de poro.
— Puntas de pipeta estériles y apirógenas para pipetas automáticas Gilford de 100 μl.

Reactivos

— Agua estéril para inyección Travenol lote T11-I21C3.
— Inyectable de ClNa 0,9 por 100 Travenol lote U1-A09C2.
— Inyectable de Bicarbonato sódico 8,4 por 100 Ibys lote V1T2.
— Reactivo Pyrogent (Mallinckrodt).
— Reactivo Coatest Endotoxin (KabiVitrum).
— Endotoxina *E. coli* 055:B5.
— Endotoxina *E. coli* 011:B4.
— Cepas hospitalarias de *E. coli* Laboratorio de Microbiología del Hospital Civil de Bilbao.

Animales

— Conejos raza albina Nueva Zelanda de 3-4 Kg de peso.

B) Métodos

Preparación de las muestras

— Inyectables no contaminados.

Se prepararon tres lotes estándar de los inyectables citados y después 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.

Según 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.

1. Recuento microbiológico

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 muestrv.

— LAL «Coatest endotoxin».

Emdotoxina *E. coli* 0111:B4.

Lectura en espectrofotómetro a 405 nm.

3. Análisis en conejos

USP XXI (1985).

10 ml/Kg (agua para inyección y cloruro sódico 0,9 por 100).

5 ml/Kg (bicarbonato sódico 8,4 por 100).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se exponen en las tablas 1, 2, 3 y 4.

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 por 100 sin contaminar son apirógenas en conejos; similares concentraciones en

TABLA I

RESULTADOS EN INYECTABLES NO CONTAMINADOS

	x, gérmenes/ml		LAL		Conejos
	P	F	Pyrogent	Coatest	
Agua para inyección	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

( ) = Número de muestras.

TABLA II

RESULTADOS EN LAS SOLUCIONES PREVIAMENTE CONTAMINADAS CON *E. COLI*

	N.º de gérmenes/ml		LAL		Conejos
	Teóricos	Viables	Pyrogent	Coatest pg/ml	
Agua para inyección	10.000	15	++	26,2	+
	1.000	8	+	25,2	—
	100	1	—	19,3	—
	10	0	—	14,1	—
Cloruro Sódico 0,9%	10.000	5.187	+	43.200*	+
	1.000	484	+	2.530*	+
	100	50	—	418*	+
	10	4	—	25,2	+
Bicarbonato sódico 8,4%	10.000	6	—	<12,5	+
	1.000	2	—	<12,5	+
	100	0	—	<12,5	+
	10	0	—	<12,5	+

* Estimadas por extrapolación.

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 por 100 con la excepción del método LAL «Pyrogent» que no fue válido para esta solución (Tabla 3). En bicarbonato sódico 8,4 por 100 no se han mostrado válidos el método LAL y el recuento bacteriano.

La inhibición en bicarbonato sódico 8,4 por 100, 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 por 100 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

TABLA III

GELIFICACION DEL LAL PYROGENT EN CLORURO SODICO 0,9% CONTAMINADO

Contaminación	Gérmenes/ml	UE/ml	pH	
			5,5	7
Endotoxina		1	+++	+++
E. coli 055:BS		0,5	++	+++
E. coli	10.000	540	+	++
	1.000	31,7	+	+
	100	5,2	—	—
	10	0,3	—	—

TABLA IV

ESTUDIO DE LA INHIBICION EN BICARBONATO SODICO 8,4%

Concentración de bicarbonato sódico en %	Endotoxina añadida (pg/ml)	pH	Resultado LAL Pyrogent
8,4	100	8,3	—
0,84	10	8,65	++
0,84	100	8,65	++
8,4	100	6,65	++
0,84	10	8,10	++
0,84	100	7,80	++

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.

CONCLUSIONES

1. Los análisis de pirógenos de los tres lotes de inyectables no contaminados han resultado negativos por el método en conejos, bajos recuentos microbianos anteriores a la esterilización y concentraciones de endotoxina menores de 40 pg/ml por el método LAL.

2. Los inyectables de agua para inyección contaminados con *E. coli* en concentraciones teóricas de 10, 100 y 1.000 gérmenes/ml y recuentos de gérmenes viables de 0 a 8 gérmenes/ml resultaron no pirógénicos en conejos; por LAL se obtuvieron concentraciones de endotoxina menores de 40 pg/ml. La dilución de 10.000 gérmenes/ml dio resultados positivos en conejos y una concentración media de endotoxina de 26,2 pg/ml.

3. En el inyectable contaminado de cloruro sódico 0,9 por 100 se obtuvieron recuentos de 4 a 5187 gérmenes/ml y concentraciones de endotoxina de 25 a 45.000 pg/ml, estimadas por extrapolación. Los resultados en conejos fueron positivos para todas las diluciones de *E. coli*.

4. En el inyectable contaminadc de bicarbonato sódico 8,4 por 100 se obtuvieron recuentos de 0 a 6 gérmenes/ml. La respuesta pirogénica en conejos no concordaba con las bajas concentraciones de endotoxina detectadas con LAL, lo que se sugiere puede ser debido a inhibición de la reacción LAL por el bicarbonato sódico, incluso en concentración de 0,84 por 100.

5. El análisis microbiológico anterior a la esterilización puede ser un método de interés para control en proceso y para prever la calidad pirogénica de los inyectables terminados. Presenta como desventajas la rapidez con la que debe realizarse el análisis, inmediatamente después del llenado de los envases, y el tiempo de espera, durante la incubación de las muestras e identificación de los gérmenes.

6. El método LAL de detección de endotoxina de gérmenes Gram-negativos se ha mostrado rápido y eficaz en agua para inyección, control de material y en proceso.

7. En cloruro sódico 0,9 por 100, con LAL «Coatest endotoxin» se han obtenido resultados concordantes en los recuentos microbianos y en conejos; con LAL «Pyrogent» se ha observado inhibición de la reacción de gelificación. Es preciso seleccionar el método LAL más adecuado para cada medicamento.

8. El bicarbonato sódico 8,4 por 100, inhibió la reacción LAL, con una concentración de endotoxina estandar presente de 100 pg/ml. Detectó concentraciones de 10 pg/ml de endotoxina estándar, diluyéndolo 1/10. Se sugiere que el posible mecanismo de la inhibición puede ser debido a la separación del ión calcio del reactivo, necesario para la reacción de gelificación del LAL.

9. El método de agregación plaquetaria ha permitido confirmar que para producirla con endotoxina, es preciso un mediador endógeno que está presente en sangre total pero no en el plasma rico en plaquetas. Sin embargo este método no resultó adecuado como ensayo de pirógenos, ya que las dosis de endotoxina necesarias para producir agregación plaquetaria son más elevadas que las dosis pirogénicas.

10. Se sugiere que en Farmacia de Hospital el análisis LAL puede ser útil por su sensibilidad y sencillez, si no se presentan interferencias. En los inyectables de administración intratecal se hace imprescindible por su mayor sensibilidad que el ensayo en conejos. Junto con el recuento microbiano anterior a la esterilización pueden ser una alternativa al análisis en conejos. Este último, por su mayor dificultad de realización en una Farmacia de Hospital, puede quedar reducido a aquellos inyectables que presentan interferencias con el análisis LAL.

BIBLIOGRAFIA

1. Cooper, J. F.; Levin, J., y Wagner, H. N. (1971): «Quantitative comparison of in vitro and in vivo methods for the detection of endotoxin». *J. Lab. Clin. Med.*, 78: 138-148.
2. Ingraham, J. L.; Maaloe, O., y Frederick, C. (1983): «Growth of the bacterial cell». Neidhart, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachussets.
3. Lacasa, C. (1986): «Pirógenos en inyectables de pequeño volumen preparados en farmacia de hospital». Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra.
4. Levin, J., y Bang, F. B. (1968): «Clottable protein in *Limulus:* its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin». *Thromb. Diathes. Haemorh*, 19: 186-197.
5. Lougtenberg, B., y Van Alphen, L. (1983): «Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram negative bacteria». *Biochim. Biophys. Acta*, 737, 51-115.
6. Marcus, S. (1964): «Determination of pyrogens using membrane filtration». Meeting of the Parenteral Drug Association. Philadelphia.
7. Morrison, D. C.; Duncan, R. L., y Goodman, S. A. (1986): «In vivo biological activities of endotoxin». En: Cate, J. W.; Buller, H. R.; Sturk, A., y Levin, J.: «Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance, and detection with the *Limulus* amebocyte lysate test». Alan R. Liss Inc. New York.
8. Pharmacopeia European (1980) 2ª ed. V.2.1.4. Part I. Maisonneuve S. A. París.
9. Rietschel, E. T.; Wollenweber, H. W.; Russa, R.; Brade, H., y Zahringer, U. (1984): «Concepts of the chemical structure of lipid A». *Rev. Infect. Dis.*, 6: 432-438.
10. Rietschel, E. T.; P ade, H.; Brade, L.; Kaca, W.; Kawahara, K.; Lindner, B.; Luderitz, T.; Tomita, T.; Schade, U.; Seydel, U., y Zahringer, U. (1985): «Newer aspects of the chemical structure and biological activity of bacterial endotoxins». En: Cate, J. W.; Buller, H. R.; Sturk, A., y Levin, J.: «Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance, and detection with the *Limulus* amebocyte lysate test». Alan R. Liss Inc. New York. pp 31-50.
11. United States Fharmacopeia XX - National Formulary XV (1980): «The United States Pharmacopeial Convention, Inc». 12601 Twinbrook Parkway, Rockville Md. 20852.