



**Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud
Escuela Profesional de Farmacia Y Bioquímica**

TESIS

**“CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE CLINDAMICINA INYECTABLE DE 600mg
MEDIANTE LA PRUEBA LAL”**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

BACHILLER: ACUÑA VILA, Pamela Alithu

ASESOR: QF. MONTEAGUDO MONTENEGRO, Fabricio

LIMA-PERÚ

2016

Dedicatoria

A Dios, por haberme dado salud , la voluntad para poder culminar esta tesis, a mi madre y padre que han sabido formarme con buenos valores y hábitos, por los buenos consejos, el apoyo y la dedicación.

Agradecimientos

A mi asesor Fabricio Monteagudo por la orientación y el seguimiento, a mis padres por ser mi motivación, a mis amigos que me sacaban más de una sonrisa durante este tiempo.

RESUMEN

La presente investigación tuvo por objeto determinar la calidad microbiológica de Clindamicina inyectable mediante la prueba LAL según lo establecido en USP 38.

Se realizó la cuantificación de endotoxinas bacterianas por la técnica de Lisado del Amebocito de Limulus (LAL) para un producto farmacéutico: clindamicina inyectable por el método de gelificación. Para ello se tomaron 40 muestras de un lote. Con las muestra del lote se realizó un pool, dándole mayor confiabilidad al método. Se comprobó la sensibilidad del reactivo de LAL (0.03 UE/ml) realizándose ensayos de verificación de sensibilidad del reactivo LAL , se calificó al operario con el fin de obtener resultados confiables. Se comprobó 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. Se realizó la prueba límite de coagulación, elaborando dos replicas para mayor confiabilidad es así que los controles positivos coagularon, los controles negativos no y el material se encuentra apirógeno,

Se consultó en la USP 38 el límite de endotoxina para clindamicina inyectable, que es de 0.58 UE/mg. Se calculó la máxima dilución válida (MDV) que fue de 1:2900; se practicaron los ensayos preliminares (Unspike y Spike) con los cuales se determinó la Dilución de trabajo para clindamicina inyectable 1:1000. Con el ensayo final se valoró la presencia de endotoxinas bacterianas que fue de 0.24 UE/mg, cumpliendo con el aspecto de calidad para la prueba LAL menor de 0.58 UE/mg como indica USP 38.

ABSTRACT

This research aims to determine the microbiological quality of Clindamycin injection by the LAL test as set out in USP 38.

Clindamycin injection by the method of gelation: quantifying bacterial endotoxins by the technique of Limulus amoebocyte lysate (LAL) for a pharmaceutical product was made. For this purpose 40 samples were taken from a batch. With a pool sample of the batch was made, giving greater reliability to the method. the sensitivity of LAL reagent (0.03 EU / ml) was found performing verification tests sensitivity of LAL reagent, the operator was described in order to obtain reliable results. It was found that the samples tested show no factor that can induce or inhibit the formation of blood clots or if there was no presence of endotoxins in the sample. the limit test performed coagulation, developing two replicas for reliability is so clotted positive controls, negative controls and the material is non-pyrogenic.

Endotoxin limit for injectable clindamycin, which is 0.58 EU / mg were consulted in USP 38. The maximum valid dilution (MVD) was calculated 1: 2900; 1000: preliminary tests (Unspike and Spike) with which the Working dilution for injectable clindamycin 1 was determined were performed. With the final test for the presence of bacterial endotoxin was 0.24 EU / mg, fulfilling the quality aspect of the LAL test lower 0.58 EU / mg as indicated USP 38 was assessed.

ÍNDICE

CARÁTULA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	xi
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.1 Descripción de la Realidad Problemática.....	1
1.2 Formulación del Problema.....	2
1.2.1 Problema General.....	2
1.2.2 Problemas Específicos.....	2
1.3 Objetivos de la Investigación.....	3
1.3.1 Objetivo General.....	3
1.3.1 Objetivos Específicos.....	3
1.4 Hipótesis de la Investigación.....	3
1.4.1 Hipótesis General.....	3
1.4.2 Hipótesis Especificos.....	4
1.5 Justificación e Importancia de la Investigación.....	4
1.5.1 Justificacion de la investigación.....	4
1.5.2 Importancia de la investigacion.....	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Antecedentes de la Investigación.....	7
2.1.1 Nacionales.....	7

2.1.2 Internacionales.....	8
2.2 Bases Teóricas.....	11
2.2.1 Toxinas Bacterianas.....	11
2.2.2. Endotoxinas.....	12
2.2.3. Estructura Química del Liposacarido.....	14
2.2.4. Regiones del Liposacarido.....	16
2.2.4.1 Region I.....	16
2.2.4.2 Region II.....	16
2.2.4.3 Region III.....	17
2.2.5 Receptores del LPS.....	17
2.2.6 Mecanismo de Acción de las Endotoxinas.....	18
2.2.7 Mecanismo de la Fiebre.....	19
2.2.8 Técnicas de Detección de Endotoxinas.....	20
2.2.9 Test de Pirógenos en Conejos.....	20
2.2.10 Test LAL.....	21
2.2.11 Origen de la Prueba Lisado de <i>Limulus</i> Amebocito.....	22
2.2.12 Reacción Bioquímica del LAL.....	25
2.2.13 Métodos del Test LAL.....	28
2.2.14 Limite de Endotoxina.....	28
2.2.15 Clindamicina Inyectable.....	29
2.3 Definición de Términos Básicos.....	32
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	35
3.1 Tipo de Investigación.....	35
3.2 Nivel de Investigación.....	35
3.3 Método de Investigación.....	35
3.4 Diseño de Investigación.....	35
3.5 Población y Muestreo de la Investigación.....	36
3.5.1 Población.....	36
3.5.1.1 Delimitación cualitativa de la población.....	36
3.5.1.2 Delimitación cualitativa de la población.....	36

3.5.2	Muestra.....	36
3.5.2.1	Criterios de inclusión.....	36
3.5.2.2	Criterios de exclusión.....	37
3.6	Variables e Indicadores.....	37
3.7	Procedimiento, Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	37
3.7.1	Procedimiento.....	37
3.7.1.1	Confirmación de la Sensibilidad del Reactivo LAL.....	38
3.7.1.2	Prueba Limite de Coagulación.....	39
3.7.1.3	Prueba Preliminar de Gel Clot.....	40
3.7.2	Técnicas.....	42
3.7.3	Método.....	43
3.7.3	Instrumentos.....	43

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN, ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	44
4.1 Análisis e Interpretación de Resultados.....	44
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	52
RECOMENDACIONES.....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Comparación De Endotoxinas y Exotoxinas.....	12
Tabla N° 2: Sensibilidad del reactivo LAL.....	44
Tabla N° 3: Confirmación De La Sensibilidad Del Reactivo LAL.....	45
Tabla N° 4: Prueba Límite De Coagulación.....	45
Tabla N° 5: Calculo Del MDV /Diluciones De Trabajo.....	46
Tabla N° 6: Estándar.....	47
Tabla N° 7: Muestra Sin Adición De Endotoxina.....	47
Tabla N° 8: Muestra Con Adición De Endotoxinas(SPIKE).....	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Organización de Membrana externa de bacterias gram negativas.....	13
Gráfico N° 2: Estructura de liposacarido liso y rugoso.....	15
Gráfico N° 3: Liberación de endotoxinas bacterianas.....	19
Gráfico N° 4: Método <i>in vivo</i> Prueba en conejo.....	21
Gráfico N° 5: Método <i>in vitro</i> Prueba de gelificación.....	22
Gráfico N° 6: Cangrejo herradura, <i>Limulus polyphemus</i>	23
Gráfico N° 7: Representación resumida de la cascada de reacciones que experimenta el reactivo LAL en presencia de Endotoxinas.....	26
Gráfico N° 8: Representación detallada de la cascada de reacciones que experimenta el reactivo LAL en presencia de endotoxinas.....	27
Gráfico N° 9: Representación de la confirmación de sensibilidad.....	39
Gráfico N°10: Prueba Limite de Coagulación.....	40
Gráfico N°11: Representación de la Prueba gel clot	42
Gráfico N°12: Calculo de las diluciones de trabajo.....	46

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica es cuidadosa en la producción de productos farmacéuticos parenterales por su condición de estériles. Para lograr este objetivo se realiza la prueba de esterilidad por filtración de membrana, que busca determinar contaminantes microbianos como bacterias, hongos y levaduras; y en segundo lugar la prueba de endotoxinas bacterianas, que detecta pirógenos; ambas son pruebas microbiológicas a las que se somete al producto terminado para declarar su liberación y posterior uso. 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 tales como *E. coli*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus* y otros¹; productos parenterales contaminados con endotoxinas provoca fiebre en el hombre y animales, estas son consideradas como pirógenos por su capacidad de generar una reacción de fiebre como respuesta inmunológica, por lo tanto los pirógenos son sustancias bacterianas que pueden resistir los métodos convencionales de esterilización presentándose en grandes cantidades después de la muerte y lisis celular.²

El presente estudio investigara un lote de Clindamicina de 600mg/4ml marca Sanderson S.A, producto farmacéutico empleado con frecuencia como antibiótico para tratamiento de determinadas infecciones. Para la identificación y determinación cuantitativa de endotoxinas se realiza la prueba LAL por medio del método de gelificación, que en presencia de éstas produce una cascada de reacciones que terminan aglutinando extractos de las células sanguíneas (amebocitos) del hemolinfa del cangrejo *Limulus Polyphemus* formando un gel; la interpretación de resultados es definida como la lectura positiva la formación de un gel y la negativa la ausencia de este³. Se realizara la cuantificación de endotoxinas para luego comparar los resultados obtenidos con el límite de endotoxinas establecido en USP 38 y de esta forma determinar si el producto evaluado aprueba los criterios de calidad.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática

En la industria farmacéutica los productos parenterales se diferencian de los demás por su alto grado de pureza, y por estar libres de contaminantes físicos, químicos y microbiológicos, ya que la presencia de cualquiera de estos puede afectar no solo la vida útil del fármaco sino también la salud del paciente³. Las preparaciones de uso parenteral deben elaborarse por procedimientos que eviten la presencia de pirógenos, es decir, de sustancias que una vez inyectadas por vía parenteral, sean capaces de provocar un proceso febril en el paciente; incrementando la severidad de la inflamación de la vía aérea, aumentando la susceptibilidad a gripes inducidas por rinovirus, provocando bronquitis crónica y enfisema con desarrollo de una obstrucción de la vía aérea irreversible luego de la exposición crónica en adultos⁴.

Estas respuestas pueden poner en peligro la vida del individuo dependiendo de su estado y la cantidad de endotoxina inyectada. Las endotoxinas son muy potentes; una *dosis* de solamente 1 a 10 ng/kg de endotoxina purificada es capaz de producir en el hombre una respuesta febril⁵.

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)⁶. La Farmacopea de los Estados Unidos (United States of Pharmacopea (USP) establece la cuantificación de endotoxinas bacterianas por el método

LAL como monitor de pirógenos para más del 90% de los parenterales que regula, exigiendo que el contenido de endotoxinas sea inferior a los límites establecidos por la guía de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration (FDA), lo que es requisito indispensable para la comercialización de cualquier producto. Los principales organismos internacionales, encargados de regular la elaboración de productos farmacéuticos exigen cada vez más en sus protocolos de calidad la aplicación del ensayo LAL, en el control de la calidad en la fabricación de medicamentos administrados por vía intravenosa.⁷

1.2 Formulación del Problema

1.2.1 Problema General

¿Cumplirá el criterio de calidad establecido en USP 38 la evaluación microbiológica en Clindamicina inyectable de 600mg marca Sanderson S.A evaluados durante el periodo Octubre a Diciembre del 2015?

1.2.2 Problemas Específicos

- ¿La prueba lisado de amebocito de *Limulus* presentara sensibilidad a la máxima dilución valida (MDV)?
- ¿Cuál será la concentración, en Unidades USP de endotoxina por mg (UE/mg) en Clindamicina inyectable?
- ¿Cuál será la cantidad de endotoxinas bacterianas en Clindamicina inyectable de 600mg de acuerdo a lo establecido en USP 38?
- ¿Cuál será la dilución máxima que presentara interferencia?

1.3 Objetivos de la Investigación:

1.3.1 Objetivo General

-Determinar si la calidad microbiológica de Clindamicina inyectable de 600mg mediante la prueba LAL aprueba el criterio establecido en USP 38.

1.3.2. Objetivos Específicos:

- Determinar la máxima dilución valida (MDV) para la sensibilidad en la prueba lisado de amebocito de *Limulus* en Clindamicina inyectable
- Determinar la concentración de endotoxinas, en Unidades USP de endotoxina por mg (UE/mg) en Clindamicina inyectable
- Cuantificar la cantidad de endotoxinas en Clindamicina inyectable de 600mg de acuerdo a lo establecido en USP 38.
- Determinar la interferencia a la maxima dilución .

1.4 Hipótesis de la Investigación

1.4.1 Hipótesis General

La calidad microbiológica de Clindamicina inyectable de 600 mg mediante la prueba LAL cumpliría el criterio establecido en USP 38

1.4.2. Hipótesis Específicos

- La muestra de Clindamicina inyectable establecería la dilución 1:2900 como máxima dilución válida (MDV) para la sensibilidad de la prueba lisado de amebocito de *Limulus*
- La concentración de endotoxinas en Unidades USP de endotoxina por mg (UE/mg) en Clindamicina inyectable se encontraría dentro del rango según lo establecido en USP38.
- La cantidad de endotoxinas en Clindamicina inyectable de 600mg se encuentra dentro del rango según lo establecido en USP38.
- La dilución 1:64 de la muestra de Clindamicina inyectable establecería la última dilución que presenta interferencia para la prueba de lisado de amebocito de *Limulus*.

1.5 Justificación e Importancia de la Investigación

1.5.1 Justificación de la Investigación

El propósito de evaluar los límites de endotoxinas declarados en USP 38 como parte del control de calidad microbiológico de un producto terminado se justifica por la capacidad que poseen las endotoxinas de resistir altas temperaturas sin sufrir alteraciones bioquímicas por lo que permanecen activas por mucho más tiempo que la bacteria misma, resisten a lisis celular y a métodos convencionales de esterilización, sustancias que administradas por vía parenteral y en dependencia de la dosis son capaces de provocar una respuesta febril, shock y muerte^{4,7}. Los

pirógenos que preocupan a la industria farmacéutica son las endotoxinas; ya que se ha comprobado que los pirógenos más importantes en fármacos inyectables son de procedencia bacteriana. El ambiente de los laboratorios, el personal, los implementos y equipos de trabajo, así como el agua y las materias primas, albergan microorganismos que se desarrollan y afectan la calidad de los medicamentos parenterales⁶.

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP 38) establece la prueba de endotoxinas bacterianas (PEB) para detectar y cuantificar endotoxinas en productos parenterales, usando un lisado de amebocitos del cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*)⁸.

Hay diferentes métodos para medir el proceso de gelificación que ocurre como respuesta de los amebocitos a las endotoxinas. Estos métodos son los llamados Gel-Clot,, turbidimetría y métodos cromogénicos. En este caso se empleara el método de gelificacion (gel clot)⁹.

1.5.2 Importancia de la Investigación

Las endotoxinas bacterianas son el contaminante más frecuente y peligroso que puede encontrarse en los productos terminados de la industria farmacéutica, por lo que las cantidades de esta toxina se regulan y controlan en la producción de soluciones parenterales.

El análisis de pirógenos constituye uno de los principales ensayos en el control de calidad de la fabricación de fármacos, por su repercusión en la salud humana¹⁰.

El método del lisado de amebocitos de *Limulus*, se ha impuesto para determinar la ausencia de pirógenos en productos terminados, sobre todo en aquellos de uso

parenteral sin embargo un ensayo LAL negativo solo indica la ausencia de endotoxinas, y no la de otros microorganismos pirógenos. 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 productos parenterales ^{6,11}.

CAPITULO II MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

2.2.1 Nacionales:

La investigación realizada por Koga Roberto, Otero Manuel, Caballero José, (2005) Perú ; **“PRUEBAS BIOLÓGICAS DEL ANTICUERPO MONOCLONAL IOR-CEA1 MARCADO CON 131I, POR EL MÉTODO DE LA CLORAMINA T, PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL ADENOCARCINOMA EMBRIONARIO”**,.Establecieron que este marcador es útil en casos de cáncer colorectal, aumentado la concentración del antígeno con relación al estadio de la enfermedad. Se procedió a realizar las evaluaciones biológicas de este anticuerpo (distribución biológica (DB), toxicidad aguda, esterilidad y pirógenos).Para las de pirógenos LAL, se realiza una dilución de 1/200 del AcMo con agua despirogenada, homogenizando con la ayuda de un vortex por espacio de 30 segundos; con una jeringa se toma 0.2 ml se agrega al tubo LAL control negativo e igual cantidad al control positivo. Incubar por 1 hora a 37 °C±1 en baño maría. Pasado el tiempo de incubación, el tubo de control positivo debe formarse una fase sólida y el control negativo mantenerse en fase líquido. Finalmente se concluye que para las pruebas biológicas tenemos un producto estéril, no tóxico y libre de pirógenos ¹².

2.2.2. Internacionales:

La investigación realizada por Burguet Lago Nancy, Reyes Tur María Isabel, Brito Godoy Lázaro C., Troche Concepción Yenilen, (2012) Cuba. **“VALORACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS EN EL INYECTABLE ÁCIDO ZOLEDRÓNICO MEDIANTE LA PRUEBA DE LISADO DEL AMEBOCITO DE *LIMULUS*”**. Establecieron la valoración de las endotoxinas en cuatro ampollas de tres lotes de ácido zoledronico de 4mg, mediante el método de gelificación (gel-clot) los resultados fueron: la sensibilidad del lisado resultó 0,03125 UE/mL. La máxima dilución válida fue de 112 UE/mL y la dilución de trabajo 1/100. La cantidad de endotoxinas bacterianas presentes en tres lotes del producto inyectable no sobrepasó el límite establecido 0.875 UE/mg según lo establecido por USP 32, por lo que cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el ensayo ¹³.

La investigación realizada por Carrillo C., Ospina J., Aldana D., Arias J., Echeverri C., (2006) Colombia; **“ESTANDARIZACIÓN Y VALORACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS POR LA TÉCNICA DE LISADO DEL AMEBOCITO DE *LIMULUS* (LAL) PARA DOS PRODUCTOS FARMACÉUTICOS: PENICILINA G SÓDICA Y RANITIDINA INYECTABLE POR EL MÉTODO DE GELIFICACIÓN”**. Establecieron que para la investigación se tomarían tres muestras de tres lotes diferentes; las muestras fueron escogidas al azar y se tomó una muestra del principio, una de la mitad y otra del final de la producción para cada lote muestreado. Con las muestras de cada lote se realizó un pool, quedando así tres sublotes para analizar, dándole mayor confiabilidad al método. Se comprobó la sensibilidad del

reactivo de LAL (0.25 UE/ml) y se calificó al operario con el fin de obtener resultados confiables. Se consultó en la USP XXVI el límite de endotoxina para penicilina G sódica, 0.01 UE/100 UI y ranitidina 7 UE/mg. Se calculó la máxima dilución válida (MDV) que fue de 1:400 y 1:700 respectivamente; se practicaron los ensayos preliminares (Unspike y Spike) con los cuales se determinó la Dilución de trabajo para penicilina 1:100 y ranitidina 1:200. Con el ensayo final se valoró la presencia de endotoxinas bacterianas en los dos productos inyectables. En el ensayo Unspike se demostró que el producto analizado de penicilina G sódica y ranitidina, no presentan endotoxinas, ni sustancias que pudieran dar falsos positivos, pues los resultados de todas las diluciones de las dos réplicas incluidos sus controles, fueron negativos ¹⁴.

La investigación realizada por Rivera Zumaque Pablo C, (2005) Colombia; **“ESTUDIO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ENDOTOXINAS EN MEDICAMENTOS DIPIRONA Y CLINDAMICINA”**. Hace referencia a la validación del método LAL que se llevó a cabo para la detección y cuantificación de endotoxinas bacterianas. Se validó la prueba de endotoxinas bacterianas para los productos farmacéuticos inyectables: dipirona 2.5g/ 5ml y clindamicina 300mg/ml obteniéndose como resultado el límite de endotoxinas, la máxima dilución válida y la dilución de trabajo para cada uno. Se determinó la máxima dilución válida (MDV) para Dipirona 2.5g/5ml que fue de 1:175, y la dilución de trabajo escogida es de 1:100, para la clindamicina inyectable 300mg/ml la máxima dilución válida fue de 1:690, y la dilución de trabajo escogida es de 1:200. La sensibilidad del LAL empleado para el ensayo fue de 0.25 UE/ml. Se comprobó que los productos farmacéuticos en su composición

presentan agentes inhibidores los cuales afectan la detección de la endotoxina por parte del reactivo LAL , solo hasta cierta dilución la concentración de estos agentes no es significativa para interrumpir la reacción. Se concluyó que el producto dipirona y clindamicina no contiene endotoxinas en su composición, como tampoco excipiente que generen su inhibición ¹⁵.

La investigación realizada por Osorio Colindres Claudia Beatriz, (2011) Centro América ,**“VALIDACION DE LA PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA (LAL) POR EL METODO GEL – CLOT UTILIZANDO EL PRODUCTO FUROSEMIDA (20 MG) INYECTABLE”**. Hace referencia en la presente investigación que 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 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 ¹⁶.

La investigación realizada por Osorio, Olga, Pérez Mancilla, Ximena, Arias Palacios, Janeth, Rodríguez Vargas, Dora, Y Fernández López, Cindy, (2011) Cuba ,**“INTERFERENCIAS EN LA VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS PARA OXITETRACICLINA 50 mg/ml”**. En la siguiente investigación establecieron que el método de LAL gel-clot para validar la detección de endotoxina bacteriana en la oxitetraciclina producida por un laboratorio maquilador de productos farmacéuticos veterinarios de Bogotá, Colombia. Para este objetivo se tomaron muestras al inicio, intermedio y final de 3 lotes diferentes del medicamento y se realizó la prueba de validación tal y como lo especifica la United States Pharmacopea XXV. Los resultados para la máxima dilución válida del producto (1:80) de la prueba Spike mostraron el 100 % de inhibición hasta la dilución 1:16 y 0 % de inhibición en las siguientes diluciones. En la prueba Unspike se muestra un realce de la prueba a partir de la dilución 1:32. El rótulo para un reactivo de LAL con sensibilidad (I) de 0,25 unidades de endotoxinas por mililitro (UE/mL) y el operario que realizó el ensayo quedaron validados ¹⁷.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Toxinas Bacterianas

La intoxicación es una enfermedad originada por una toxina que puede ser exotoxina o endotoxinas (Ver cuadro comparativo en la tabla 1). La palabra toxina deriva del latín Toxicum que significa veneno y es una sustancia específica a menudo el producto metabólico del organismo que daña al hospedero.

TABLA 1: Comparación de Endotoxinas Y Exotoxinas

Características	Endotoxinas	Exotoxinas
Tipo bacteriano	Bacteria <u>gram</u> negativa	Mayoría de gran positivas , algunas gran negativas
Ubicación celular	Liposacarido de la pared celular	Citoplasma
Estructura química	Porción <u>lipídica</u> del <u>liposacarido</u>	Proteínas
Estabilidad al calor	Estable	Inestable
Toxicidad	Baja	Alta
Síntomas	Inflamación , fatiga , desordenes respiratorios , shock <u>septico</u>	Necrosis celular y tisular, efectos neurológicos
Enfermedades	Shock <u>septico</u>	Botulismo , cólera, difteria

Fuente: "Microbiología" Prescott L, Harlet, J. Klein y de "Toxinas bacterianas"

-Exotoxina: 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 (mg/g ejemplo 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 ¹⁶.

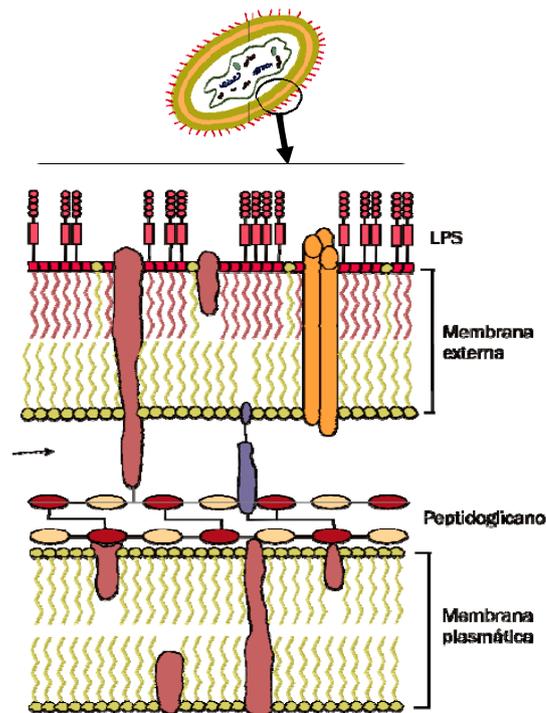
2.2.2. Endotoxinas:

La introducción del término Endotoxina esta atribuida a un discípulo de Robert Koch, Richard Pfaiffer en 1892. Este término realmente procedido por la palabra pirógeno en 1876, y todavía es frecuentemente empleado para describir en primer lugar y forma básica las propiedades biológicas de las endotoxinas, como la producción de la fiebre. Las bacterias gram negativas tienen lipopolisacáridos como parte de la capa externa de su pared celular, y bajo determinadas condiciones

estos compuestos son tóxicos. Se denominan endotoxinas porque normalmente se hallan unidas a la célula liberándose en grandes cantidades sólo cuando se lisan las células. En la mayoría de los casos, el termino Endotoxina puede compararse al de lipopolisacárido.

Aunque el término “Endotoxina” se utiliza de vez en cuando para referirse a cualquier toxina bacteriana relacionada con las células, se reserva correctamente para referirse al complejo del lipopolisacárido asociado con la membrana externa de bacterias gram negativas tales como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus*, y otros patógenos principales ¹⁵ (Figura N°1).

Grafico N° 1: Organización de Membrana externa de bacterias gram negativas



Fuente: Lúderitz, Galanos & Rietschel , “Endotoxins of Gram-negative bacteria”. Pharmacology therapeutics. 1981.

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 ^{1,16}.

2.2.3. Estructura Química del Liposacarido

Los liposacaridos (LPS) se encuentran anclados en la superficie de las bacterias, es decir, esta exclusivamente localizado en la parte exterior de la membrana externa de las mismas siendo uno de los constituyentes mayoritarios de dicha membranas. La mayoría de los LPS presentan una estructura dividida en tres partes químicamente diferenciables unidas covalentemente entre sí: una porción polisacarida llamada cadena especifica -O (conocida como antígeno -O también como cadena especifica -O), un núcleo oligosacarido y finalmente una región lipidica llamada lípido A. (Figura N^o2).

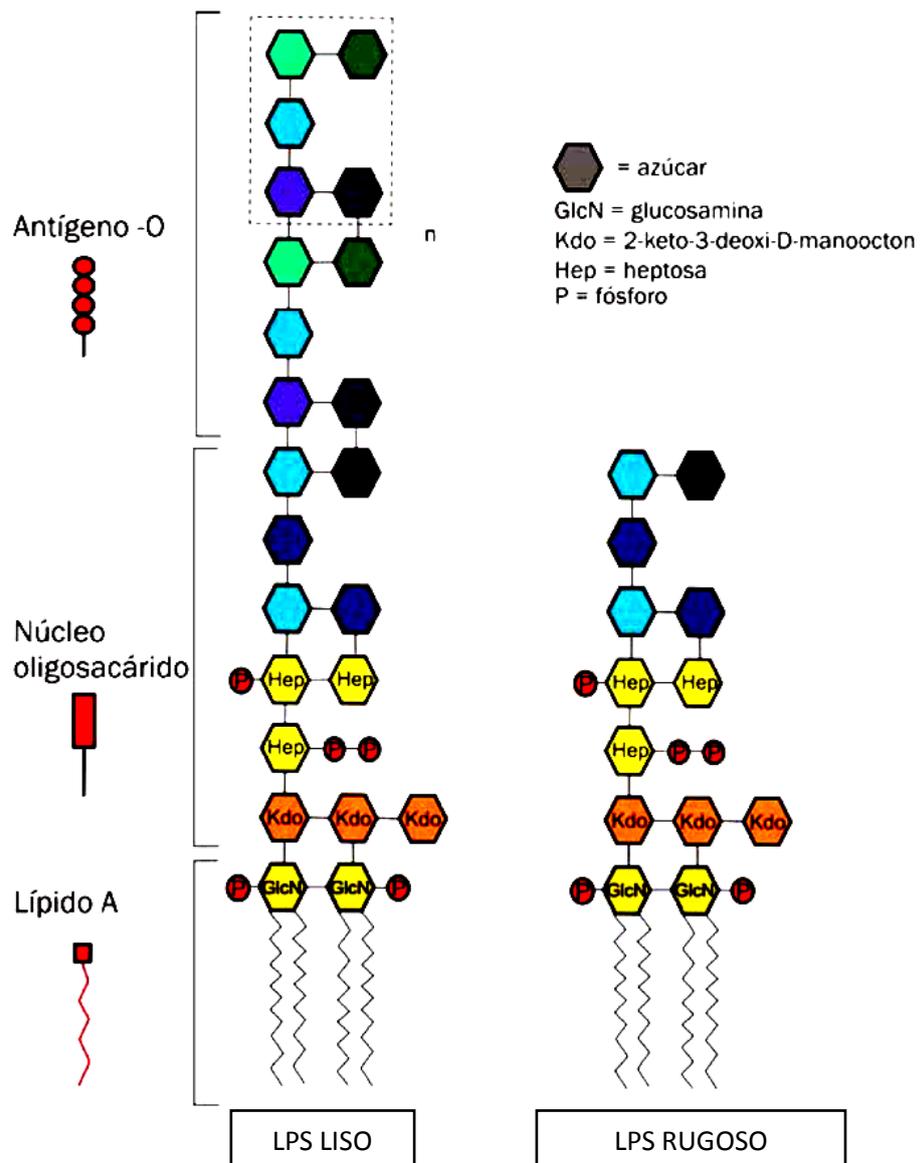
El tamaño de la molécula de LPS depende por lo tanto de las tres regiones en las que se divide y suele estar comprendido en el rango de 10 a 20 kDa. Esta diferencia en las dimensiones se debe a que las endotoxinas pueden dividirse en dos grupos las que provienen de bacterias lisas y las que provienen de colonias de bacterias rugosas. Los LPS de estas últimas no tienen región polisacarida por lo que su longitud es mucho menor (Figura N^o 2) Las bacterias rugosas son mutantes espontáneos de las bacterias lisas y son menos virulentas ya que su membrana es más permeable debido a la mayor hidrofobicidad del LPS rugoso.

La pérdida del Antígeno O da lugar a la perdida de la virulencia que sugiere que esta porción es importante durante una

interacción. Se sabe que tales mutantes “rugosos” son más susceptibles a la fagocitosis y a las reacciones bactericidas.

La región interior de LPS, del lípido que contiene en A y de tres residuos de KDO, parece ser esencial para la viabilidad, probablemente para montar la membrana ².

Grafico N° 2: Estructura de liposacarido liso y rugoso



Fuente: Caroff & Karibian., "Structure of bacterial lipopolysaccharides"
 ,Carbohydrate Research 2003.338(23)

2.2.4. Regiones del Liposacarido

2.2.4.1 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 Gram negativas.

2.2.4.2 Región II: núcleo o polisacárido R

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 Gram negativas: 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 Gram negativas.

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

2.2.4.3 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 ^{18, 19}.

La gran variación ocurre en la composición de los azúcares en la cadena lateral de O entre la especie e incluso las tensiones de bacterias gram negativas. Las variaciones en el contenido del azúcar del polisacárido O contribuyen a la amplia variedad de tipos antigénicos de Salmonella y de *E. coli* y probablemente a otras tensiones de especies gram negativas. Los azúcares particulares en la estructura, especialmente las terminales, confieren especificidad inmunológica del Antígeno de O, además de determinar la estructura del lipopolisacárido, liso o rugoso ²⁰.

2.2.5 Receptores del LPS:

En el torrente sanguíneo el LPS que se ha liberado tras la división o la muerte de las bacterias, se une a la proteína sérica llamada proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) y este complejo se une al receptor CD14. El CD14 es un antígeno del sistema inmune de los mamíferos cuyo objetivo es actuar de receptor del LPS en la membrana bacteriana. El CD14 existe en dos formas, una soluble (sCD14) y otra unida a la membrana bacteriana (mCD14). Los dos tipos de receptor actúan de forma

similar en presencia de LPS. Sin embargo, el verdadero receptor para la transcripción del LPS se ha identificado hace poco años, el receptor tipo Toll-ike receptor -4 (TLR 4).

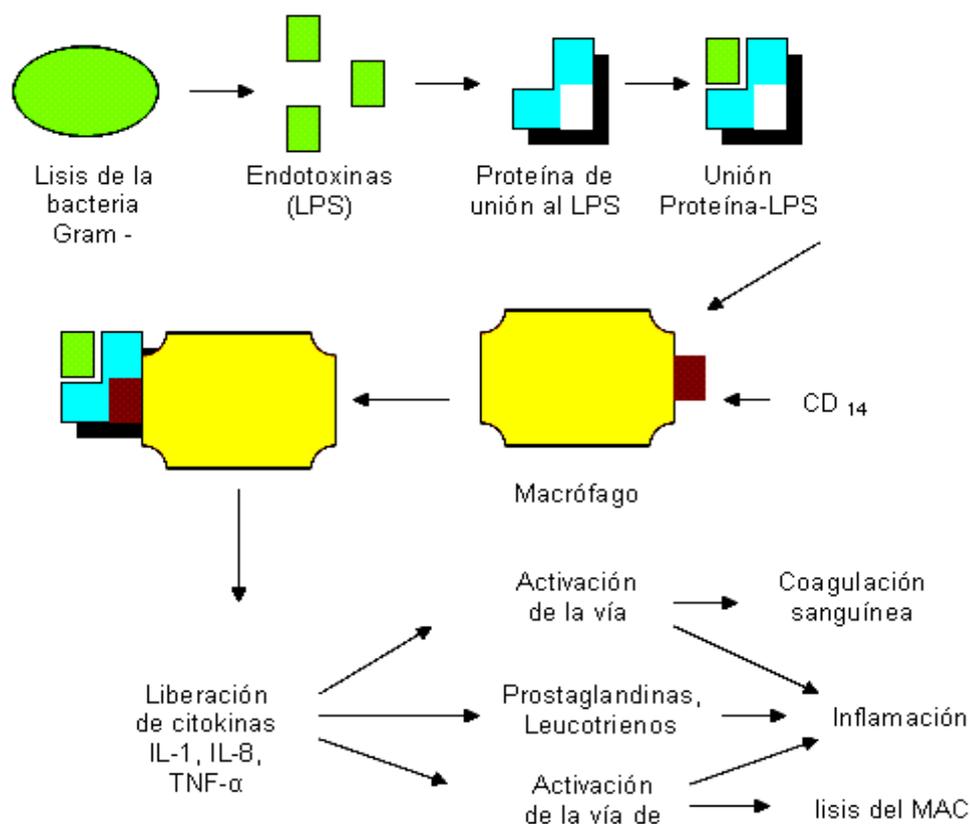
La identificación de esta proteína de la membrana plasmática ha sido el descubrimiento más significativo de la biología de las endotoxinas en las últimas décadas. El TLR-4 necesita una molécula adicional para el reconocimiento efectivo del LPS, la glicoproteína MD-2.

El complejo de (LPS + proteína de unión a liposacrido) se une al CD4 y se transfiere al complejo TLR-4/MD-2. A continuación se activan diferentes secuencias de síntesis intracelulares como consecuencia de la identificación del liposacrido desembocando en la liberación de citoquinas como TNF- α y IL-1 β ^{21,16}.

2.2.6 Mecanismo de Acción de las Endotoxinas :

Una vez liberado la endotoxina de la membrana bacteriana tras la lisis, el LPS por sí mismo no ataca al sistema inmunológico, su naturaleza virulenta viene dada por su capacidad para activar macrófagos, monocitos y provocar una respuesta. La primera medida de nuestro organismo es detectar los microorganismos extraños, no asociadas a células humanas. Como respuesta a la presencia de LPS , los macrófagos y monocitos secretan citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) o las interleuquinas(IL-1 β ,IL-6) que actúan como mediadores en la estimulación de otras células. Se ha demostrado que tras una serie de reacciones las endotoxinas activan los sistemas de producción de complementos celulares, quininas y el sistema de coagulación del organismo ²² . (Figura N°3)

Grafico N°3: Liberación de endotoxinas bacterianas



Fuente: [http://ri.ues.edu.sv/2457/1/Validaci%C3%B3n_de_la_prueba_de_endotoxina_bacteriana_\(LAL\)_por_el_m%C3%A9todo_Gel-Clot_utilizando_el_produ.pdf](http://ri.ues.edu.sv/2457/1/Validaci%C3%B3n_de_la_prueba_de_endotoxina_bacteriana_(LAL)_por_el_m%C3%A9todo_Gel-Clot_utilizando_el_produ.pdf)

2.2.7 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 (interleukina 1), TNF - (Factor de necrosis tumoral alfa), IL - 6, etc. Las tres primeras citokinas 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 ¹⁹.

2.2.8 Técnicas de Detección de Endotoxinas

En la actualidad existen tres métodos aprobados y validados por la legislación para detección de endotoxinas: el test de pirógenos en conejos (*rabbit pyrogen test* RPT) el test *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) y el test de pirógenos in vitro (IPT). Además de estas tres técnicas, existen métodos no validados pero específicos para la detección de endotoxinas (endolisa, MAT, etc.) y técnicas analíticas generales que pueden utilizarse para la detección de pirógenos.

2.2.9 Test de Pirógenos en Conejos

El RPT es un test de pirógenos in vivo basado en la reacción febril de los conejos al inyectarles una solución que contiene pirógenos. Los conejos tienen una respuesta inmune similar a los humanos frente a las endotoxinas, por lo que con la monitorización de la temperatura corporal de los animales es posible determinar de forma cualitativa la presencia de pirógenos ²¹.

Este test fue adoptado como sistema de control de preparaciones parenterales durante muchos años, a pesar de tener muchos inconvenientes.

En primer lugar se trata de un método cualitativo, por lo que la presencia de pirógenos no puede determinarse de forma cuantitativa que es lo que demandan las farmacopeas de todo el mundo. Además de esto, la sensibilidad que se consigue

con esta tecnología no es suficiente (50-350 pg/ml, 0.5-3.5 EU/ml) y este tipo de ensayos es incompatible con algunos productos que deben ser evaluados (aquellos que no pueden ser inyectados) ^{21,23}.

Grafico N°4: Método *in vivo* Prueba en conejo



Fuente: Castro Loa Fernando Adrian López Rangel Lourdes Villa Pérez
Diana Gabriela 9FM1 - QFI Equipo

2.2.10 Test LAL

Las instituciones reguladoras internacionales establecen que el método de análisis de endotoxinas estandarizado es el test LAL (*Limulus amoebocyte lysate*). El LAL es un extracto de las células sanguíneas del cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus*) que reacciona con las endotoxinas o liposacáridos formando un coágulo. Esta reacción es en la que se basa el test LAL y se utiliza como método de detección y cuantificación de endotoxinas.

El cangrejo no puede responder a una infección bacteriana produciendo anticuerpos, por lo que sus amebocitos actúan como sistema inmune. Cuando el sistema inmunológico del cangrejo detecta la presencia de endotoxinas, las células sanguíneas se activan movilizándose hacia la bacteria invasora

formando un coagulo a su alrededor. El cangrejo puede sobrevivir hasta a una coagulación masiva de su sistema circulatorio. En el ser humano por lo contrario, la coagulación intravascular derivada de la presencia de endotoxinas lleva a la muerte del individuo ²¹.

Grafico N°5: Método *in vitro* Prueba de gelificación



Fuente: Nature PBS, <https://k12.kn3.net/AB69B6FB9.jpg>

2.2.11 Origen de la Prueba Lisado de *Limulus* Amebocito

EL CANGREJO DE LA HERRADURA (*Limulus polyphemus*):
Este artrópodo conocido también como “casco de caballo” vive en las costas de Estados Unidos desde Florida hasta Maine,

data de hace 5000 años atrás teniendo su origen en el período Cámbrico. (Figura N°4) Es una especie importante tanto para la comunidad biomédica como también para la sobrevivencia de aves, tortugas marinas y otras especies con quienes comparte una relación simbiótica, formando parte de la ecología y vida marina de ese lugar. Su importancia se acrecentó en los años 60 cuando los investigadores norteamericanos Levin y Bang observaron que al inyectar bacterias al cangrejo se producía coagulación masiva y más tarde descubrieron que su sangre podía ser usada para detectar endotoxinas exógenas en fármacos, material médico y en agua. Al inicio se le empleaba como diagnóstico de bacterias Gram negativas, pero con el tiempo y hasta la fecha se comenzó a utilizar como ensayo de rutina para la determinación y cuantificación de endotoxinas ¹⁰.

Grafico N°6: Cangrejo herradura, *Limulus polyphemus*



Fuente: Castro, 2009

-RESEÑA HISTÓRICA: En 1956, el patólogo Frederik Bang descubrió que una infección de bacterias marinas toxicas provoca la formación de coágulos en la sangre de los cangrejos herradura, incluso cuando las bacterias estaban muertas. Sin

embargo no fue hasta 1965 cuando Bang F.B y Levin Jack demostraron la implicación de las endotoxinas en este proceso de coagulación al reaccionar con una proteína de los amebocitos del cangrejo, reportaron que las preparaciones de Endotoxina termoestable aisladas de *Escherichia coli* y *Vibrio marino*, inducía la coagulación extracelular de la hemolinfa del *Limulus polyphemus*, conocido como cangrejo de herradura. Este efecto había sido reportado por Loeb L. en 1909 en los cangrejos, pero sin definir la causa que lo inducía ¹⁵.

Los estudios de Levin y Bang, les permitió discernir lo siguiente. Los Amebocitos, las células constituyentes de la hemolinfa del cangrejo eran requeridas para la coagulación, la ruptura de los Amebocitos desencadenaba igualmente la reacción y cantidades de Endotoxina eran inactivadas por la reacción de coagulación; posteriormente se encontró que la inactivación era debida a un proceso de detoxificación normal por parte del cangrejo, mediante la acción de un lipoproteína y un sistema de complemento de la hemolinfa del *Limulus*, la eliminación de las proteínas descritas por la técnica de extracción con cloroformo, permitió establecer que la reacción de gelificación era debida a una reacción enzimática que requería de las proteínas coagulantes que se encontraban en los Amebocitos Según Sullivan & Watson (1974).

En estudios posteriores se desarrollo un ensayo sensible para determinar endotoxinas en plasma humanos usando el material de lisado de Amebocitos de *Limulus*, detectando cantidades de 0.0005µg de Endotoxina por mL y encontraron que la reacción era dependiente de la concentración de Endotoxina usada. Yin Et y colaboradores en 1972 refinaron el ensayo de Endotoxina de Levin para detectar picogramos de Endotoxina y demostraron que la porción del lípido A del lipopolisacárido era

responsable de la gelificación del lisado. Según Levin y Tomasulo (1970).

El reactivo celular que resulto fue llamado Lisado de Amebocitos de *Limulus*. El nombre LAL es extremadamente descriptivo: *Limulus*, es el nombre genérico para los cangrejos de herradura: Amebocitos, son las células sanguíneas que contienen los componentes activos de reacción; y Lisado, describe el proceso original usado por Levin y Bang para obtener estos componentes. En el proceso Levin y Bang, los Amebocitos, después de ser separados del plasma (hemolinfa), son suspendidos en agua destilada en donde son lisados (rotos) debido a la alta concentración de sal que contiene los Amebocitos vs la ausencia de sal en el agua destilada. Este proceso con algunas modificaciones mínimas es usado todavía para producir LAL. Según Prior (1990)^{15,10}.

En 1977 la FDA publico los estándares definitivos de producción de LAL y otorgo la primera licencia para la elaboración y comercialización del test LAL a la empresa Associates of Cape Cod, Inc. (ACC). Tras esto el test LAL se establece como la prueba homologada para el control del contenido de endotoxinas tanto en procesos de fabricación como en producto terminado , sustituyendo a test de pirógenos en conejos ²¹.

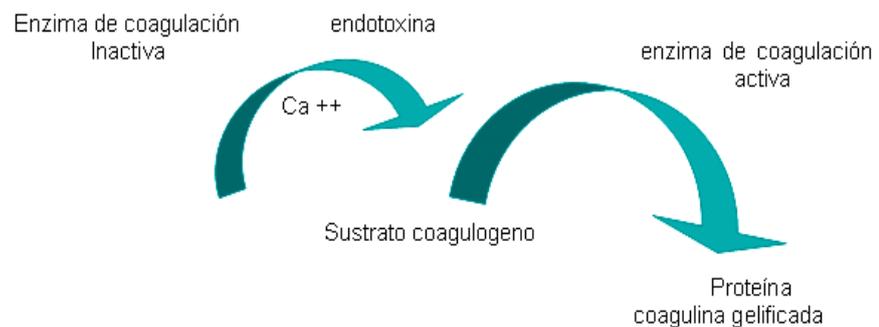
2.2.12 Reacción Bioquímica del LAL

La proteína responsable de la coagulación ha sido llamada coagulógeno que en mamíferos correspondía al fibrinógeno. En cascada el producto llega hasta la coagulina que en mamíferos es equivalente a la fibrina. Es aquí donde la similitud entre la sangre del cangrejo y de los mamíferos terminan en coagulación, a menos que la coagulina no forme uniones

covalentes entre las moléculas cuando el coagulo es formado. Esto significa que el coagulo del cangrejo de herradura es físicamente frágil y se desintegra muy fácilmente, este hecho probablemente contribuye a la habilidad de los cangrejos para sobrevivir a la coagulación de su sistema circulatorio¹⁵.

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). (Figura N°5)

Grafico N° 7: Representación resumida de la cascada de reacciones que experimenta el reactivo LAL en presencia de Endotoxinas



Fuente:

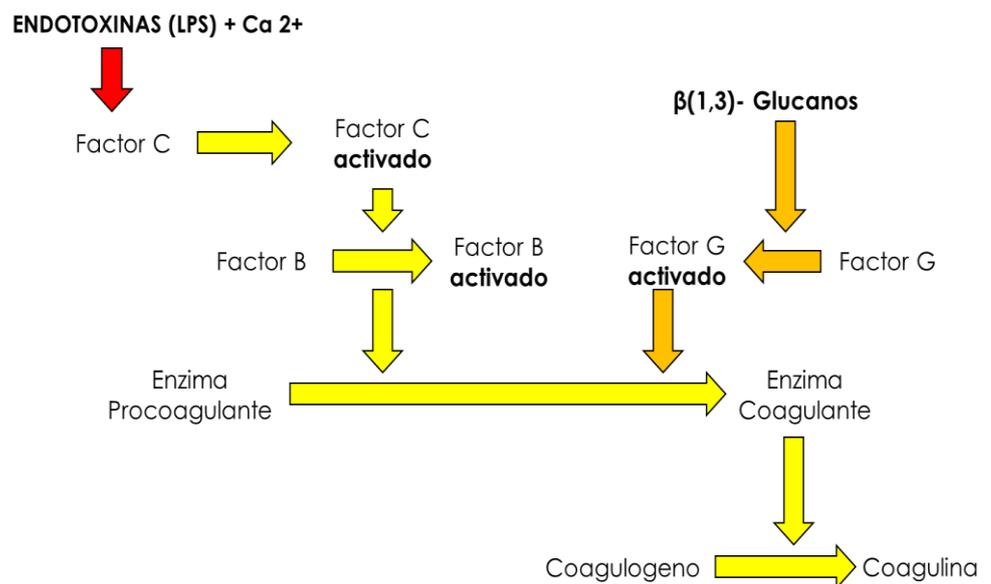
[http://ri.ues.edu.sv/2457/1/Validaci%C3%B3n_de_la_prueba_de_endotoxina_bacteriana_\(LAL\)_por_el_m%C3%A9todo_Gel-Clot_utilizando_el_produ.pdf](http://ri.ues.edu.sv/2457/1/Validaci%C3%B3n_de_la_prueba_de_endotoxina_bacteriana_(LAL)_por_el_m%C3%A9todo_Gel-Clot_utilizando_el_produ.pdf)

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^{++}) 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.

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.^{16,18} (Figura N°6).

Grafico N°8: Representación detallada de la cascada de reacciones que experimenta el reactivo LAL en presencia de endotoxinas



Fuente:

[http://ri.ues.edu.sv/2457/1/Validaci%C3%B3n_de_la_prueba_de_endotoxina_bacteriana_\(LAL\)_por_el_m%C3%A9todo_Gel-Clot_utilizando_el_produ.pdf](http://ri.ues.edu.sv/2457/1/Validaci%C3%B3n_de_la_prueba_de_endotoxina_bacteriana_(LAL)_por_el_m%C3%A9todo_Gel-Clot_utilizando_el_produ.pdf)

2.2.13 Métodos del Test LAL

En la actualidad existen tres métodos diferentes de detección de endotoxinas que utilizan el LAL:

- Método cromogenico: en este test, el reactivo LAL está unido a un cromoforo sintético que se activa tras la reacción con las endotoxinas. Esto hace necesaria la utilización de un lector óptico y la sensibilidad que alcanza el método es de 0.005 EU/ml.
- Método Turbimetrico: Es el método más sensible llegando a medir 0.001 EU/ml. Se basa en el incremento de la densidad óptica (turbidez) de la muestra al producirse la coagulación y requiere un lector óptico.
- Método gel – clot: Es el método más sencillo ya que la detección de endotoxinas se fundamenta en la formación del gel. El ensayo se realiza en tubos de ensayo y la lectura del resultado se realiza invirtiendo los tubos de forma manual. Es menos sensible que los otros métodos alcanzando un límite de 0.03 EU/ml. Sin embargo es el más utilizado por las farmacopeas europea, japonesa , estadounidense ^{21,9}.

2.2.14 Limite de Endotoxina

El límite de endotoxinas para seres humanos está 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. ^{23,7}.

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 (M). 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 ^{1,21}.

2.2.15 Clindamicina Inyectable

Es un antibiótico que pertenece al grupo de los lincosánidos, es un derivado sintético de la lincomicina con mejor absorción por vía gastrointestinal y espectro más amplio. Actúa inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, impidiendo la inhibición de la cadena peptídica.

Se utiliza para el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias gram positivas sensibles a este antibiótico, especialmente en pacientes que son alérgicos a los del grupo de las penicilinas.

USOS TERAPÉUTICOS:

Tratamiento de infecciones provocadas por bacterias sensibles a la clindamicina localizadas en el tracto respiratorio, la piel, el abdomen, los huesos, infecciones ginecológicas y dentales graves. Tratamiento de focos de pus localizados. Tratamiento de infecciones cerebrales y pulmonares en pacientes con SIDA

CONTRAINDICACIONES:

La clindamicina puede interactuar con los siguientes medicamentos: aminoglucósidos (amikacina, gentamicina), pancuronio, rocuronio, ciprofloxacino, eritromicina, cloranfenicol. Si toma alguno de estos medicamentos consulte con su médico o farmacéutico.

DOSIFICACIÓN:

La clindamicina inyectable puede administrarse por vía intravenosa o intramuscular. La dosis adecuada de clindamicina puede ser diferente para cada paciente. A continuación se indican las dosis más recomendadas: Dosis usual intravenosa o intramuscular en adultos: En infecciones moderadas: de 1,2 a 1,8 g de clindamicina repartidos en 3-4 administraciones al día. En infecciones graves: de 2,4 a 2,7 g de clindamicina repartidos en 2-4 administraciones al día. La dosis máxima diaria es de 4,8 g al día. Dosis usual intravenosa o intramuscular en niños mayores de 1 mes: De 20 a 40 mg de clindamicina por kg de peso repartidos en 3-4 administraciones al día. Dosis usual intravenosa o intramuscular en niños menores de 1 mes: De 15 a 20 mg de clindamicina por kg de peso repartidos en 3-4 administraciones al día. Por inyección intramuscular no deben administrarse más de 600 mg de clindamicina por dosis.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:

Este medicamento debe administrarse con especial precaución en pacientes con antecedentes de enfermedades intestinales como diarrea o colitis, enfermedad de hígado o enfermedad del riñón. Para que el tratamiento con clindamicina sea eficaz, debe administrarse el tratamiento durante 10 días, aunque se haya producido una mejoría de los síntomas. Como consecuencia del tratamiento con clindamicina puede aparecer diarrea de intensidad moderada o grave. Si aparece una diarrea intensa, suspenda inmediatamente el tratamiento con clindamicina, no tome ningún medicamento antidiarreico y consulte a su médico

Embarazo: En caso de embarazo su médico decidirá la conveniencia de usar este medicamento. Consulte a su médico o farmacéutico antes de usar un medicamento.

Lactancia: En caso de estar en período de lactancia su médico decidirá la conveniencia de usar este medicamento. Consulte a su médico o farmacéutico antes de usar un medicamento.

POSIBLES EFECTOS ADVERSOS:

Alteraciones gastrointestinales: La diarrea es el efecto secundario más frecuente, pudiendo acompañarse de la presencia en heces de sangre y moco. Otras reacciones adversas gastrointestinales son náuseas, vómitos, dolor abdominal, flatulencia (gases) y gusto metálico desagradable después de la administración por vía intravenosa de dosis altas.

Reacciones alérgicas: La más frecuente es la aparición de lesiones en la piel que pueden tener un aspecto variado (por ejemplo, similares a la del sarampión) y que, en ocasiones, pueden llegar a ser graves. También puede producirse enrojecimiento de la piel. Otras posibles reacciones adversas son picor, hinchazón de la cara y dificultad para respirar.

Alteraciones de la piel y membranas mucosas: Se han descrito casos de picor y vaginitis (inflamación de la vagina) y, raramente, casos de inflamación de la piel con descamación.

Reacciones locales: Dolor, induración (endurecimiento de tejidos) y absceso estéril después de la inyección intramuscular y tromboflebitis (formación de coágulo con inflamación de venas) después de la infusión intravenosa.

Alteraciones hepatobiliares: Ictericia (color amarillo de la piel y mucosas) y alteraciones de las enzimas hepáticas (por ejemplo de las transaminasas).

Alteraciones de la sangre: Se han comunicado casos tanto de disminución como de aumento de ciertas células de la sangre, tales como los glóbulos blancos, así como disminución de las plaquetas.

Alteraciones renales: Se han observado algunos casos de aumento de la urea en la sangre, menor eliminación de orina y/o exceso de proteínas en la orina, que evidencian una disfunción renal.

Alteraciones cardiovasculares: Raramente se ha dado algún caso de colapso cardiopulmonar e hipotensión (disminución de la presión arterial) tras una administración intravenosa demasiado rápida.

Si se observa alguna de estas reacciones o cualquier otra reacción no descrita en este prospecto, consulte a su médico o farmacéutico.

2.3 Definición de términos Básicos

- Agua apirogena USP: Agua altamente purificada ausente de endotoxinas detectables en la técnica LAL
- Certificado de Análisis: Certificado de estandarización, el cual define la actividad biológica del CSE en UE/mg y documentada la determinación del promedio de calibración del RSE/CSE.
- Control de endotoxina estándar (CSE): Endotoxina purificada de *E.coli* la cual es estandarizada contra una endotoxina estándar de referencia (RSE). El CSE es suministrado por el proveedor del LAL.
- Desencadenamiento o Realce: Es una condición de la muestra en el reactivo LAL, que incrementa la reactividad del LAL a la detección de endotoxina, sin general interferencias en la técnica
- Producto farmacéutico parenteral: se refiere a las presentaciones farmacéuticas que se administran en grandes o pequeños volúmenes, por vía Intramuscular e intravenosa.

- Endotoxina: Molécula tóxica derivada de la membrana celular exterior de las bacterias gram negativas. La endotoxina es una molécula compuesta por un lípido A y otros componentes de la pared celular. Es llamada pirógeno debido a que induce fiebre.
- Endotoxina estándar de referencia (RSE): La endotoxina estándar de referencia de la farmacopea de los Estados Unidos USP, también conocida como EC-6. Es un liofilizado de una endotoxina derivada de *E.Coli* que es mantenida por la USP, Rockville .MD. RSE es suministrada bajo el nombre de US Endotoxina estándar por el centro biológico de la FDA para licenciar los reactivos LAL
- Falsos negativos: Ocurre cuando la reacción de endotoxinas y LAL es inhibida por diversos factores: PH, cationes divalentes, agentes quelantes, y residuos de NaOH en el material de vidrio
- Falsos Positivos: ocurre cuando el LAL reacciona con una sustancia que no es endotoxina, como por ejemplo: glucanos.
- FDA: Administración de vigilancia de drogas y alimentos de los Estados Unidos, que regula los productos del LAL y los estudia a través del centro para evaluación biológica e investigación.
- Inhibición: condición donde la muestra en el test LAL disminuye la sensibilidad al LAL de controles de interferencia
- Interferencia: algún tipo de desencadenamiento químico o físico, o condición de inhibición, el cual altera la recuperación de endotoxina en una muestra. La inhibición es la mayor razón por la que se hace validación.
- Lambda (λ): Símbolo para la sensibilidad del LAL dado en UE/ml, para el ensayo del gel-clot.
- Límite de endotoxinas: es el máximo aumento de endotoxinas permitido en un producto parenteral o aparato médico. Los límites son específicos para cada producto. El límite de endotoxina dado por la FDA para fármacos es de 5UE/Kg/hr o 0.2 UE/Kg/hr para productos intratecales, el límite para aparatos es de 0.5 UE/ml.

- Lisado de Amebocito Limulus: Extracto acuoso de células sanguíneas circulantes (amebocitos) del cangrejo de herradura, *Limulus polyphemus*.
- Lipopolisacárido (LPS): Endotoxina bacteriana purificada, libre de proteína.
- Máxima dilución válida (MDV): Cálculo usado para determinar cuándo producto parenteral o materia prima puede ser diluido y aun detectar el límite de endotoxina.
- Mínima concentración válida (MCV): Es la más baja concentración de fármaco específica que puede permitir la detección del límite de endotoxina
- Spike: muestra a la cual se le ha condicionado una concentración de endotoxina, con título conocido, con el propósito de verificar si hay interferencia por parte de la muestra a la endotoxina, con una serie de diluciones, usando la técnica del LAL gel-clot.
- Unspike: muestra a la cual se le realizan diluciones en agua apirógena, con el propósito de verificar si existe algún tipo de inhibidor o sustancia potenciadora que reacciones con el reactivo LAL.

CAPITULO III

METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

3.1 Tipo de Investigación

Aplicativo: Porque la ejecución del proyecto se realizara por una técnica establecida por USP 38

3.2 Nivel de Investigación

Descriptivo : Utiliza la lógica o razonamiento deductivo, comienza con la teoría y se derivan expresiones lógicas (hipótesis) que el investigador busca someter a prueba.

3.3 Método

Inductivo : Porque el proceso de investigación va desde de lo específico del ensayo aplicado a un lote de ampollas de Clindamicina hacia lo general como característica de toda la población. El método empleado es deductivo.

3.4 Diseño de Investigación

No Experimental : Porque la presente investigación lleva su proceso sin manipular la variable independiente porque son intrínsecamente no manipulables. Es decir solo se medirá la cantidad.

3.5 Población y Muestreo de la investigación

3.5.1 Población

3.5.1.1 Delimitación cualitativa de la población:

La población de la investigación está constituida por todas las muestras de ampollas de Clindamicina 600mg/4ml de las marca Sanderson S.A que se expenden en la farmacia del hospital nacional Guillermo Almenara Irigoyen en el periodo de octubre a diciembre de 2015.

3.5.1.2 Delimitación cuantitativa de la población:

El tamaño de la muestra seleccionada está determinado por el numero de lote de ampollas de Clindamicina 600mg/4ml de la marca Sanderson S.A seleccionada.

3.5.2 Muestra

Se recolecta 40 ampollas de 600mg/4ml de la serie 75IG1328 marca Sanderson S.A.

3.5.2.1 Criterios de inclusión

- Denominación comercial Clindamicina 600mg/4ml inyectable
- Presentación de ampollas de Clindamicina 600mg/4ml
- Fabricado por laboratorios Sanderson S.A
- Pertenece a la marca Sanderson S.A

3.5.2.2 Criterios de exclusión.

- Que no presente denominación comercial Clindamicina 600mg/4ml inyectable
- Que no tenga la presentación de ampollas de Clindamicina 600mg/4ml
- Que no sea fabricado por laboratorios Sanderson S.A
- Que no sea de la marca Sanderson S.A

3.6 Variables e Indicadores

-Variable Independiente (Y):

VARIABLE	INDICADORES
Calidad microbiológica de Clindamicina inyectable de 600mg	Unidades de endotoxina por mg
	Unidades de endotoxina por ml
	Por encima del valor establecido en USP 38
	Por debajo del valor establecido en USP 38

-Variable Dependiente (X):

VARIABLE	INDICADORES
La prueba LAL	Visualización de la gelificación

3.7 Procedimientos, Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

3.7.1 Procedimientos

3.7.1.1 Confirmación de la Sensibilidad del Reactivo LAL

- El vial que se utilizó para la prueba , tiene 5000 UE/vial de potencia I como cuyo certificado reporta
- Se reconstituyó el vial de endotoxinas con 5mL de agua apirógena certificada, se homogenizó en un vortex intermitentemente por 30 minutos en una cabina de flujo laminar , con ayuda de micropipetas calibradas y material despirogenado se obtuvo 1000 UE/ml
- -Se preparan las diluciones para obtener las concentraciones de endotoxina de 2λ (0,06 UE/mL), λ (0,03 UE/mL), $0,5\lambda$ (0,015 UE/mL), $0,25\lambda$ (0,0075 UE/mL).

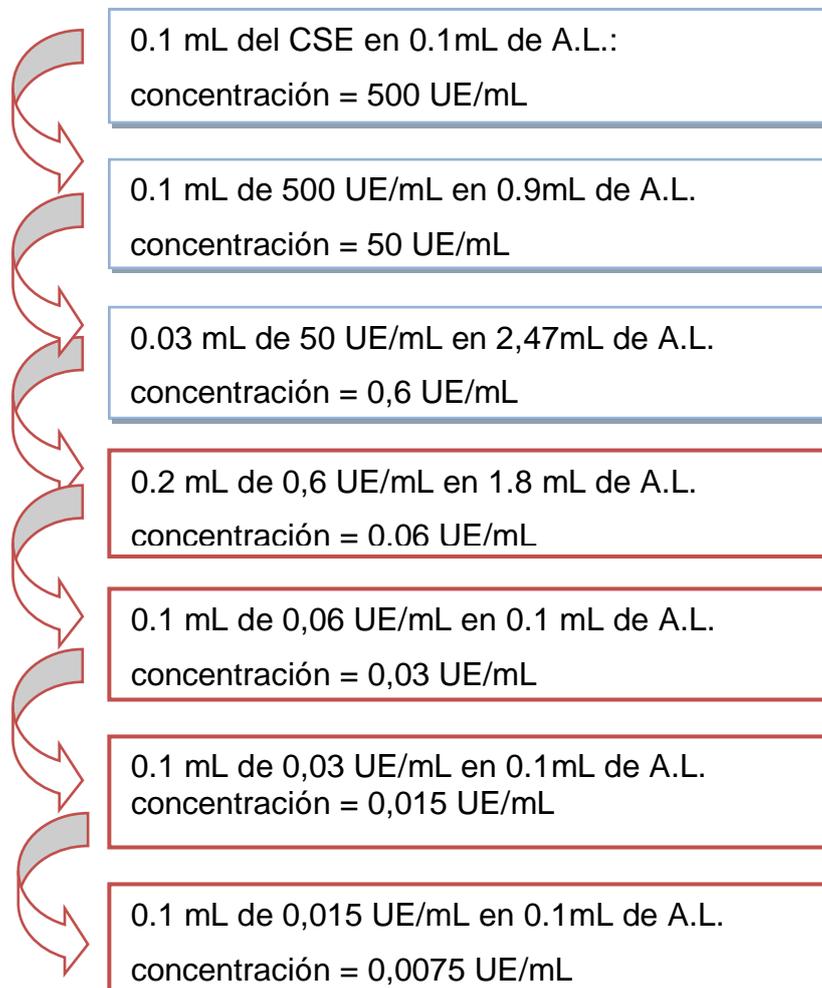
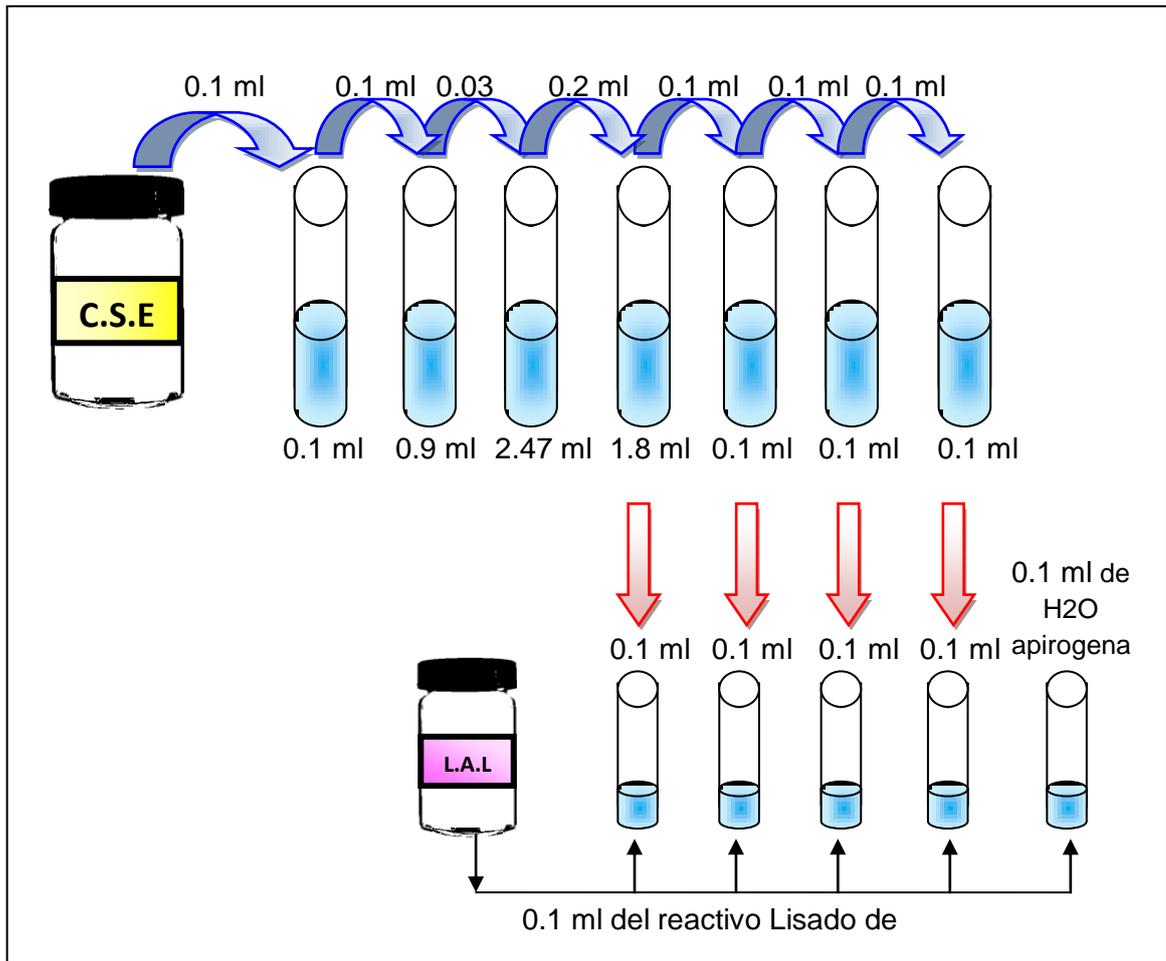


GRAFICO N°9: Representación de la Confirmación de la Sensibilidad



FUENTE: Elaboración propia.

3.7.1.2 Prueba Limite de coagulacion

- El pH es importante ya que, sólo en este rango se producirá la coagulación. Así que se determinó el pH de la mezcla: muestra para verificar que encuentre entre: 6,0 – 8,0. , encontrándose en 7.26
- El primer tubo se le añadió 0.1ml de la MDV de la muestra con 0.1ml reactivo LAL
- El segundo tubo se le añadió 0.1 ml de la MDV de la muestra con 0.1ml de CSE 2λ ,se añadió 0.1ml de reactivo LAL .

- Se preparó 3 tubos con 0.1ml de agua LAL, dos de ellas siendo control negativo una de ellas siendo el material, otro con solo el agua LAL y el control positivo que consiste de agua LAL a la cual se le añadió 0.1ml de CSE 2λ, se añadió 0.1ml de reactivo LAL a cada tubo.
- Se agitó la gradilla con los tubos por 20 a 30 segundos para homogenizar.
- Se colocó la gradilla en un baño maría regulado a 37 +/- 1° C por 60 +/- 2 minutos controlados con un cronómetro.
- Se retiró la gradilla lentamente, se realizó las lecturas y se reportó como positivo o negativo, aprobado o rechazado.

GRAFICO N°10: Prueba Limite de Coagulación

Solución*	Concentración de Endotoxina/ Solución a la que se Agrega Endotoxina	Número de Repeticiones
A	Ninguna/Solución Muestra Diluida	2
B	2λ/Solución Muestra Diluida	2
C	2λ/Agua para PEB	2
D	Ninguna/Agua para PEB	2

* Preparar la *Solución A* y la *Solución B* de control positivo del producto utilizando una dilución no mayor que la MDV y tratamientos según se indica en la *Prueba de Factores de Interferencia en Pruebas Preparatorias*. Las *Soluciones B* y *C* de control positivo contienen la *Solución Estándar de Endotoxina* a una concentración que corresponde al doble de la sensibilidad declarada del lisado. La *Solución D* de control negativo consiste en *Agua para PEB*.

FUENTE:USP 38

3.7.1.3 Prueba Preliminar de Gel Clot : Cuantificación

Se coloca en la gradilla dos filas de tubos cada fila con 13, se marco cada fila de tubos de izquierda a derecha de la siguiente manera:

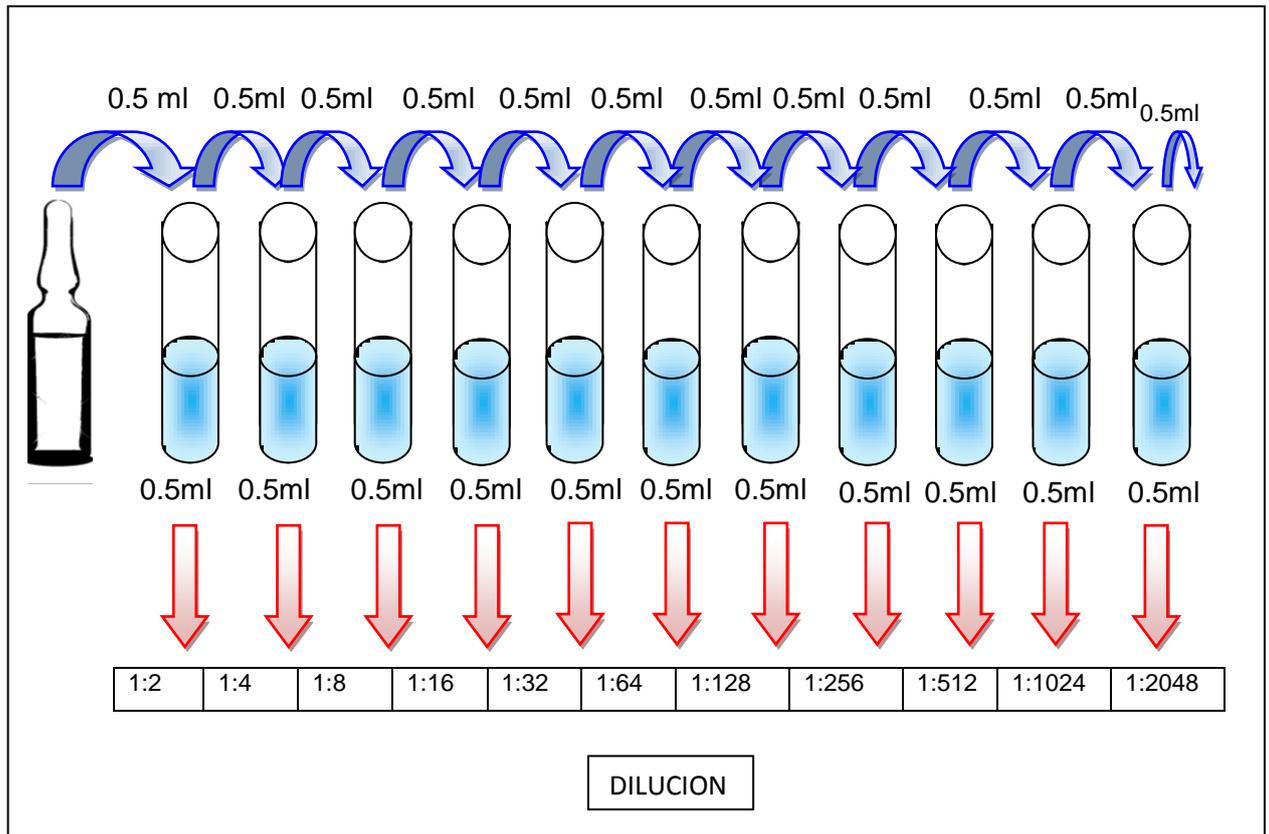
- Dilución 1: 2, 0.5ml de muestra en 0.5ml de Agua LAL.
- Dilución 1:4, 0.5ml de dilución 1: 2 en 0.5ml de A.L.
- Dilución 1:8, 0.5ml de dilución 1: 4 en 0.5ml de A.L.
- Dilución 1:16, 0.5ml de dilución 1: 8 en 0.5ml de A.L.
- Dilución 1: 32, 0.5ml de dilución 1: 16 en 0.5ml de A.L.
- Dilución 1 : 64, 0.5ml de dilución 1: 32 en 0.5ml de A.L
- Dilución 1: 128, 0.5ml de dilución 1: 64 en 0.5ml de A.L.
- Dilución 1 : 256, 0.5ml de dilución 1: 128 en 0.5ml de A.L
- Dilución 1 : 512, 0.5ml de dilución 1: 256 en 0.5ml de A.L
- Dilución 1 : 1024, 0.5ml de dilución 1: 512 en 0.5ml de A.L
- Dilución 1 : 2048, 0.5ml de dilución 1: 1024 en 0.5ml de A.L

Se transfirió 0.1mL de cada dilución a 4 series de pirotubos. (2 series como control del producto y 2 series para añadir endotoxinas)

Se adiciono a cada uno de los tubos , con la ayuda de la micropipeta ,el reactivo LAL a la muestra y los controles positivos.

La incubación se realizó a una temperatura de 37 +/- 1° C, durante 60 minutos +/- 2 minutos

GRAFICO N°11: Representación de la Prueba gel clot



FUENTE: Elaboración propia.

3.7.2 Técnicas

Medición cuantitativa y cualitativa de los indicadores, (muestreo de población), mediante la prueba lisado de amebocito de *Limulus*

Para detectar o cuantificar endotoxinas de bacterias gram-negativas usando un lisado de amebocitos del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*).

Hay tres métodos para éste ensayo: el método de coagulación (gel-clot), la cual está basada en la formación de gel en presencia de cationes divalentes; el método turbidimétrico, basado en la producción de turbidez después de la ruptura de uniones de un sustrato endógeno; y el método cromogénico que se basa en el desarrollo de color

después de la ruptura de un complejo sintético péptido-cromógeno.

3.7.3 Método

Gel- clot o gelificación en una tabla de resultados.

La reacción desarrollada en el tubo de ensayo es la misma que ocurre in vivo en la hemolinfa del cangrejo de herradura cuando éste tiene contacto con alguna endotoxina bacteriana.

Se considera una prueba positiva cuando el gel se mantiene íntegro al invertir el tubo 180° y una prueba negativa cuando no hay formación de un gel firme.

3.7.4 Instrumentos

- Ficha de resultados

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN, ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se realizó la prueba de endotoxinas bacterianas por el método de lisado de amebocitos de Limulus LAL , para el producto Clindamicina 600 mg/4ml.

4.1 Analisis e Interpretacion de Resultados

TABLA N° 2 :SENSIBILIDAD DEL REACTIVO LAL

Tubos N°	Concentración del CSE (UE/ml)				Control (-)
	2 λ	λ	0,5λ	0,25λ	
1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
3	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
4	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

FUENTE: Elaboración propia.

-Interpretación:

La sensibilidad del reactivo LAL frente al control estándar de endotoxinas, para detectar concentración de endotoxinas es mínima de 0.03 UE/ml (λ) como indica en el rotulado del vial

**TABLA N° 3 :CONFIRMACION DE LA SENSIBILIDAD DEL REACTIVO
LAL**

Tubos N°	Punto final UE/ml	Logaritmo Punto Final	Promedio	Antilogaritmo
1	0.03	-1.5229	$\bar{X} = \frac{-6.0916}{4}$ $= -1.5229$	Antilog -1.5229 = 0.03
2	0.03	-1.5229		
3	0.03	-1.5229		
4	0.03	-1.5229		
		$\Sigma = 6.0916$		

FUENTE: Elaboración propia.

-Interpretación:

En la media geométrica se divide el promedio entre el número de repeticiones confirmando la sensibilidad de 0.03 del Reactivo LAL, Lote:514-07-696

TABLA N° 4: PRUEBA LÍMITE DE COAGULACIÓN

Replicas	A	B	C	D	E
	Muestra	2 λ de CSE	2 λ de CSE/ agua LAL	agua LAL	MATERIAL
1	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)

FUENTE: Elaboración propia.

Interpretación:

Los resultados fueron los esperados con el reactivo LAL, los controles positivos coagularon, los controles negativos no y el material se encuentra apirógeno.

TABLA N° 5: CALCULO DEL MDV /DILUCIONES DE TRABAJO

CALCULO MAXIMA DILUCION VALIDA			
Concentración del producto/ unidades device utilizadas	Volumen diluyente/volumen de lavado	Límite de endotoxinas	Sensibilidad del reactivo LAL (λ)
600 mg/4 ml	-----	< 0.58	0.03

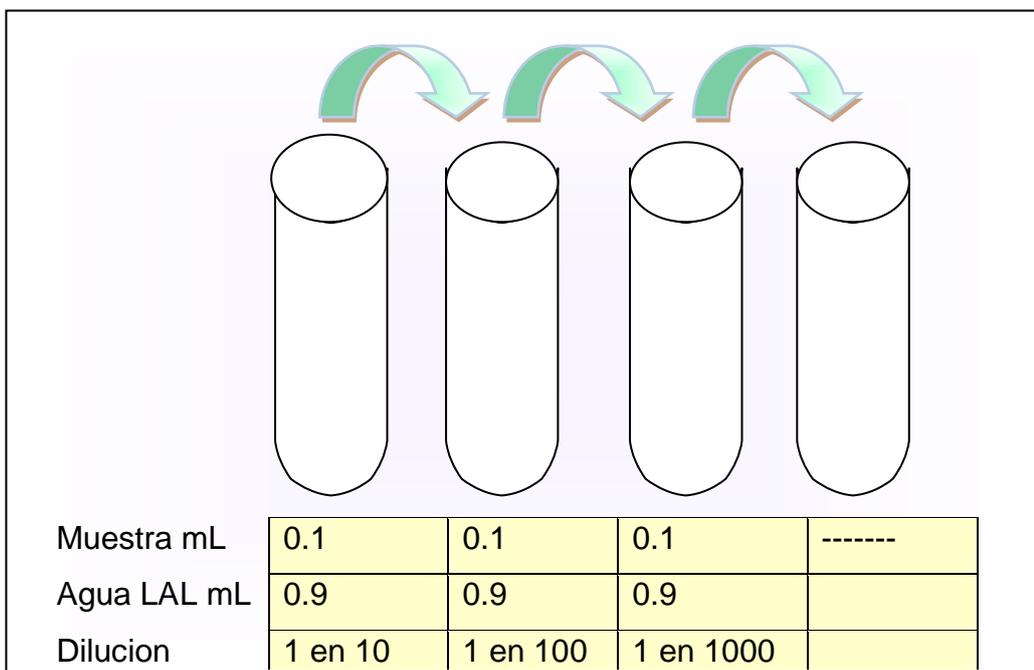
FUENTE: Elaboración propia.

$$MDV = \frac{[Producto] \times \text{Limite de Endotoxina}}{\lambda}$$

$$MDV = \frac{(600\text{mg}/4\text{ml}) \times 0.58 \text{ UE/mg}}{0.03 \text{ UE/ml}}$$

MDV = 2900

GRAFICO N°12: Calculo de las diluciones de trabajo



FUENTE: Elaboración propia

RESULTADOS OBTENIDOS PRUEBA GEL CLOT- CUANTIFICACION

Muestra: Clindamicina Ampolla

Lote: 75IG1328

F/Exp: 07/2017

TABLA N° 6: Estándar

Tubos N°	Diluciones de Trabajo				Control (-)
	2 λ	λ	0,5 λ	0,25 λ	
Muestra	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

FUENTE: Elaboración propia

TABLA N° 7: Muestra sin adición de endotoxinas

Ítem	Diluciones de Trabajo											
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Muestra	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

FUENTE: Elaboración propia

TABLA N° 8: Muestra con adición de endotoxinas (SPIKE)

Ítem	Diluciones de Trabajo											
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Control	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
positivo	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

FUENTE: Elaboración propia

Interpretación: La muestra contiene menor de 0.24 unidades USP de Endotoxinas en la dilución de prueba , debido a que la dilución de prueba mínima encontrada fue 1 en 8

DISCUSIONES

- El método que se llevó a cabo en esta tesis para la detección y cuantificación de endotoxinas bacterianas , fue el test LAL gel-clot (gelificación o coagulación), debido a que la interpretación es bastante definida , la formación de geles viscosos que no se mantienen al ser invertidos indica la presencia de endotoxinas en una concentración menor al límite de detección del reactivo , lo que se consideró como resultado negativo.
- La reacción LAL se ve interferida frecuentemente por la muestra y puede ser causada por los diferentes factores , la inhibición es el tipo de interferencia más común y se reconoce por una disminución de la sensibilidad del LAL , algunos factores como pH de la muestra , alcoholes , sal excesiva, agentes quelantes , cationes divalentes, en este caso no se considera el pH como factor de inhibición ya que se obtuvo un pH dentro del rango en la muestra .
- La investigación. “Valoración de Endotoxinas Bacterianas en el Inyectable Ácido Zoledrónico mediante la prueba de lisado del Amebocito De *Limulus*”, realizada por Burguet Lago Nancy, Reyes Tur María Isabel, Brito Godoy Lázaro C., Troche Concepción Yenilen, (2012) Cuba. La sensibilidad del lisado resultó 0,03125 UE/mL. La máxima dilución válida fue de 112 UE/mL en esta investigación se empleó una sensibilidad 0,03 como se recomienda para estas pruebas , lo que permitio eliminar los interferentes y conduce a un mejor resultado ya que la cantidad de endotoxinas bacterianas presentes en tres lotes del producto inyectable no sobrepasó el límite establecido 0.875 UE/mg según lo establecido por USP 32
- En el trabajo de tesis “” Estandarización y valoración de endotoxinas bacterianas por la técnica de lisado del amebocito de *Limulus* (LAL)

para dos productos farmacéuticos: Penicilina G sódica y Ranitidina inyectable por el método de gelificación”. realizada por Carrillo C., Ospina J., Aldana D., Arias J., Echeverri C., (2006) Colombia, también se siguieron los lineamientos de la USP, FDA y la guía de los fabricantes. Se observa que se trabajó con un reactivo de menor sensibilidad (0,25 UE/mL) lo que condujo a un MDV de 1:400 y 1:700 respectivamente; si se hubiere empleado la sensibilidad 0,03 como se recomienda para estas pruebas el MVD hubiera permitido eliminar con mejor resultado los posibles interferentes.

- La investigación; “Estudio de Validación del Método de Endotoxinas en medicamentos Dipirona y Clindamicina” realizada por Rivera Zumaque Pablo C, (2005) Colombia. Se validó la prueba de endotoxinas bacterianas para los productos farmacéuticos inyectables: dipirona 2.5g/ 5ml y clindamicina 300mg/ml obteniéndose como resultado el límite de endotoxinas, la máxima dilución valida la máxima dilución valida fue de 1:175 y 1:690 ,la dilución de trabajo 1:100 y 1:200 respectivamente para cada uno. La sensibilidad del LAL empleado para el ensayo fue de 0.25 UE/ml además se comprobó que los productos farmacéuticos en su composición presentan agentes inhibidores los cuales afectan la detección de la endotoxina por parte del reactivo LAL . En el caso que se hubiese empleado una sensibilidad mayor como la que se empleo en la presente tesis (0.03 UE/ml) se hubiese podido eliminar mediante las diluciones hasta llegar a la MDV los interferentes que afectan la prueba ya que con la sensibilidad de 0.25 UE/ml no se puede asegurar que hasta cierta dilución la concentración de estos agentes no sea significativa para interrumpir la reacción. Finalmente en esta investigación se concluyó que el producto dipirona y clindamicina no contiene endotoxinas en su composición, como tampoco excipiente que generen su inhibición , si se hubiese empleado un reactivo con mayor sensibilidad no se hubiese presentado estas dificultades.

- La investigación, "Validación de la prueba de Endotoxina Bacteriana (LAL) por el Método Gel – Clot Utilizando El Producto Furosemida (20 Mg) Inyectable" realizada por Osorio Colindres Claudia Beatriz, (2011) Centro América. En esta investigación se buscó validar la prueba de endotoxinas bacterianas por el método gel – clot utilizando el producto Furosemida (20 mg/2ml) solución inyectable. 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. Por eso mismo no se tuvo problemas en la prueba de endotoxinas bacterianas, se usó la sensibilidad de 0.125UE/ml la cual también es ideal para los ensayos de gel-clot mas aunque también la concentración y la cantidad de la ampolla de furosemida 20mg/2ml es menor que la clindamicina 600mg/4ml q se usó en la presente tesis.
- La investigación, "Interferencias en la validación del ensayo de lisado de amebocitos de Limulus para oxitetraciclina 50 mg/ml" realizada por Osorio, Olga, Pérez Mancilla, Ximena, Arias Palacios, Janeth, Rodríguez Vargas, Dora, Y Fernández López, Cindy, (2011) Cuba. En la siguiente investigación establecieron que el método de LAL gel-clot para validar la detección de endotoxina bacteriana en la oxitetraciclina producida por un laboratorio maquilador de productos farmacéuticos veterinarios de Bogotá, Colombia. Para este objetivo se tomaron muestras al inicio, intermedio y final de 3 lotes diferentes del medicamento y se realizó la prueba de validación tal y como lo especifica la United States Pharmacopea XXV.. El rótulo para un reactivo de LAL con sensibilidad (I) de 0,25 unidades de endotoxinas por mililitro (UE/mL) los resultados para la máxima dilución válida del producto (1:80) de la prueba Spike mostraron el 100 % de inhibición

hasta la dilución 1:16 y 0 % de inhibición en las siguientes diluciones. En la prueba Unspike se muestra un realce de la prueba a partir de la dilución 1:32, en este trabajo a diferencia de la presente tesis se utilizaron muestras del fármaco en diferentes etapas de su elaboración , con la sensibilidad de 0.25 UE/ml una sensibilidad no tan alta , sino mas bien baja para un ensayo de cuantificación pero ideal para un ensayo de tipo cualitativo es asi que lo usaron para detectar la presencia de endotoxinas en las diferentes etapas, como un ensayo de rutina asi mismo es una forma para ver si existe alguna filtración o exposición en alguna etapa de la fabricación del medicamento.

CONCLUSIONES

- Se concluye que la calidad microbiológica de Clindamicina inyectable de 600 mg mediante la prueba LAL cumple el criterio establecido en USP 38
- La muestra de Clindamicina inyectable establece la dilución 1:2900 como máxima dilución válida (MDV) para la sensibilidad de la prueba lisado de amebocito de *Limulus*
- La concentración de endotoxinas en Unidades USP de endotoxina por mg (UE/mg) es menor de 0.58 en Clindamicina inyectable la cual se encuentra dentro del rango según lo establecido en USP38.
- La cantidad de endotoxinas en Clindamicina inyectable de 600mg fue de 0.24 UE/mg debido a que la dilución de prueba mínima encontrada fue 1:8 la cual se encuentra dentro del rango según lo establecido en USP38.
- La dilución 1:64 de la muestra de Clindamicina inyectable no fue la última dilución que presentó interferencia para la prueba de lisado de amebocito de *Limulus* sino la dilución 1:4
- Las diluciones de trabajo se fundamenta en el hecho de ser diluciones no cercanas a la máxima dilución válida, y si bien es un dato teórico nos ayuda en la parte experimental cuando se requiere repetir una prueba, se escoge ni la más próxima a la dilución cuya detección de endotoxina formó un gel firme.

- Es determinante en la investigación saber si el fármaco que se esta dispuesto a investigar presentara dificultades o incompatibilidades con los reactivos, mediante la bibliografía
- Para la prueba de endotoxinas bacterianas mediante el método de Gel-Clot para productos farmacéuticos como ampollas, gotas oftálmicas, sueros es importante la cantidad , concentración de estos para establecer datos reales que nos ayuden desde la elección de la concentración del reactivo hasta lo que es toda la parte experimental .

RECOMENDACIONES

- Antes de comenzar el procedimiento es indispensable tener como referencia el certificado que expide el proveedor en el que se especifica la potencia y se asegura que puede ser usado , para la obtención de resultados confiables
- Las pruebas de endotoxina de rutina como la confirmación de la sensibilidad del reactivo LAL son importantes ya que afirman la validez de la prueba y la muestra , con el resultado de controles positivos y negativos y es necesarias realizarlas
- Al momento de reconstituir el reactivo LAL no se debe agitar, sino se recomienda mantener en reposo por 10 minutos hasta que el liofilizado se disuelva solo.
- Se recomienda Verificar el pH de la mezcla, de la muestra , ya que es importante para q se produzca la cascada de reacciones
- Al realizar la Confirmación de la sensibilidad del reactivo, agitar en vortex por lo menos 1 minuto entre cada dilución, de preferencia se recomienda usar un cronometro
- Tener listo el baño maría por lo menos a la mitad del trabajo y regulado a la temperatura deseada.
- Durante la adición de las soluciones a los pirotubos introducir la punta de la micropipeta hasta aprox. 2cm para evitar que la solución quede en las paredes de los tubos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Solís Asencios, Jenny Susan. "Validación de la prueba de endotoxinas bacterianas LAL (Limulus ameobocyte lysate) por el Método de Gel Clot en Clindamicina 600 mg inyectable". [Tesis Licenciatura] , Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Perú, 2004.
2. Sucup Moran Cecilia Nichte . Activación De Un Sistema De Filtrado Para La Purificación de Agua utilizada en la elaboración de soluciones Parenterales masivas e implementación de un control para su mantenimiento. [Tesis Licenciatura] Universidad De San Carlos De Guatemala, Facultad de Ingeniería, Guatemala 2009.
3. Natalia Caro C., Yehimy C. Méndez. "Validación de las pruebas de esterilidad por la técnica de filtración por membrana y endotoxinas bacterianas por el método de LAL en 3 productos farmacéuticos". [Tesis Doctoral] Pontificia Universidad javeriana, Bogotá D.C: Facultad de Ciencias Microbiología Industrial; 2006.
4. Gonzales María Lisa. Endotoxinas y su importancia en la salud pública [en línea] (2014). [fecha de acceso 11 de noviembre de 2015].; URL disponible en :<http://www.tecnologosmedicos.org/home/images/pdf/lectura-endotoxinas-su-importancia-sal.pdf>
Consultado : 10 de noviembre de 2015
5. Agustín, González Sánchez, and Gutiérrez Silva Enrique. Validación de la prueba de lisado de amebocito de Limulus (LAL) para la detección de endotoxinas bacterianas en soluciones parenterales. [Tesis Licenciatura] Universidad de Guadalajara, Centro universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias; Zaponan 1994.
6. Rolando Perdomo Morales. Ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL), Rev. Cubana Farm (Cuba) [en línea].2004 [fecha de acceso 11 de noviembre de 2015]. 38(1); 1-9. URL disponible

en : http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152004000100008

7. Burguet, Nancy; Brito, Lázaro César. Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica. *Vaccimonitor*, Rev. Cubana Farm (Cuba) [en línea].2012 [fecha de acceso 11 de noviembre de 2015], vol. 21, no 3, p. 32-36. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025028X2012000300006&script=sci_arttext
8. US Pharmacopeal Convention XXXVIII, Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional, 2015, p. 93-97.
9. Pyrostar. Aplicaciones del ensayo de LAL en la industria farmacéutica [Sitio en internet]. Disponible en : <http://www.wakopyrostar.com/blog-es/post/aplicaciones-del-ensayo-de-lal-en-la-industria-farmaceutica/> Consultado : 10 de noviembre de 2015
10. Ronald N. Bezofzky; Karen Zink Mc Cullough. Applications of LAL IN pharmaceuticals and medical devices, immunology of insects and other arthropods, USA: Walkersville; 1990, Pag 431-433.
11. Vila Jato Jose Luis, Tecnología farmacéutica, volumen (2), España, Editorial Síntesis. 2001.pag 164-190
12. Caballero, J. Pruebas biológicas del anticuerpo monoclonal IOR-CEA1 marcado con 131 I, por el método de la cloramina t, para el diagnóstico precoz de enfermedades relacionadas con el adenocarcinoma embrionario. Instituto Peruano de Energía Nuclear. Informe científico tecnológico. Lima, Perú 2005. pag.146-148
13. MSc. Nancy Burguet Lago, MSc. María Isabel Reyes Tur, MSc. Lázaro C. Brito Godoy, MSc. Yenilen Troche Concepción. Valoración de endotoxinas bacterianas en el inyectable ácido zoledrónico mediante la prueba de lisado del amebocito de *Limulus* Revista Cubana de Farmacia. [en línea] 2012 mayo 23 [fecha de

- acceso 2 de noviembre de 2015]; 46(3). URL disponible en : http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol46_3_12/far05312.htm
14. Carrillo, C., Ospina, J., Aldana, D., Arias, J. D. C., & Echeverri, C. Valoración de endotoxinas bacterianas en ranitidina y penicilina G sódica inyectable mediante la prueba de Lisado del Amebocito de *Limulus*. *Universitas Scientiarum*, 2006. 11(1), 15-28.
 15. Pablo C. Rivera Zumaque. Estudio de validación del método de endotoxinas en medicamentos de dipirona y clindamicina control y análisis microbiológico de materias primas PACERIZU; Cordova: Artículos relacionados con las áreas de Educación y Farmacia, Agencia de Analistas y Asesores de Droguerías y Farmacias, 2005.
 16. Claudia B. Osorio Colindres. Validación de la prueba de endotoxina bacteriana (LAL) por el método gel – clot utilizando el producto furosemida (20 mg) inyectable. [Tesis de Licenciatura]. San Salvador: Facultad de Química y Farmacia; Universidad del Salvador; 2011.
 17. Osorio Rojas, O., Pérez Mancilla, X. C., Arias Palacios, J., Rodríguez Vargas, M., & Fernández López, C. M. Interferencias en la validación del ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* para oxitetraciclina 50 mg/mL. *Rev Cub de Farmacia*, 41(1) (2007)
 18. Sterikon plus Bioindicator Manual de uso Artículo Merck 1.10274.0001 / 1.10274.0002 Alemania
 19. Prescott L, Harley J, Klein D, *Microbiología*, 4, España, Editorial Mc Graw Hill Interamericana 1999.
 20. Zinsser H, *Microbiología*, 20, Buenos Aires, Editorial Panamericana, 1997.- 75 - Associates of Cape Cod Inc., LAL Methods and applications, Massachusetts, Associates of Cape Cod Inc. 1999.
 21. Zuzuarregui Olasagasti, Ana. "Desarrollo de un sistema de detección de endotoxinas basado en la optimización e implementación de un protocolo de biofuncionalización sobre un

- biosensor electroquímico de diseño específico." [Tesis Doctoral]. Donostia- San Sebastian ,2013.
22. Sierra-Filardi, Elena, et al. Marcadores de activación alternativa de macrófagos: DC-SIGN y FR β . 2010.
23. Food and Drug Administration, Guideline on Validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end product endotoxin test for human and animal parenteral drug, biological products and medical devices. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm310098.pdf> Consultado : 10 de noviembre de 2015
24. Celina Silva Ostronoff, Felipe Rebelo Lourenço. Measurement uncertainty of chromogenic lal assays - reaction time and proportion of endotoxin and LAL reagent affects release of p-nitroaniline, São Paulo-Faculdade de Ciências Farmacêuticas. [Sitio en internet]. Disponible en: <https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=940&numeroEdicao=22> Consultado: 10 de noviembre de 2015

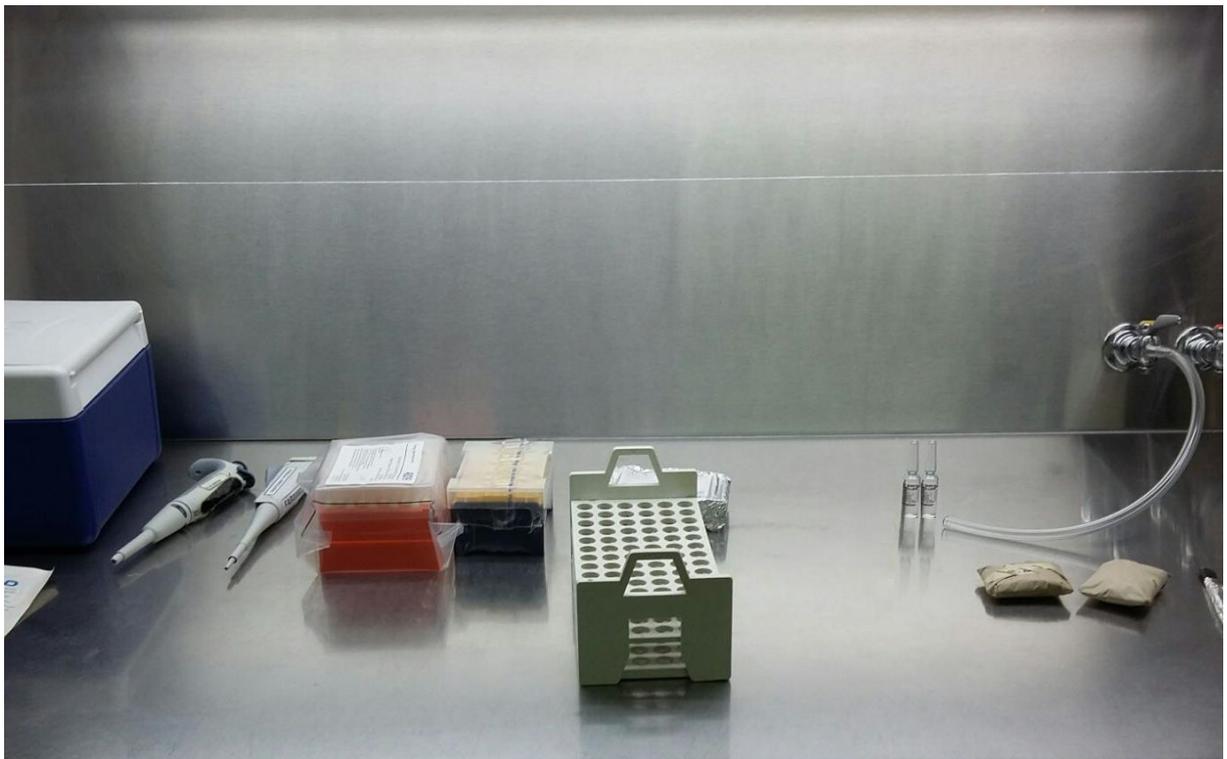
ANEXOS

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Proyecto de Tesis: Calidad microbiológica de Clindamicina inyectable de 600mg mediante la prueba

Bachiller : ACUÑA VILA, Pamela Alithu

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION	METODO Y DISEÑO DE INVESTIGACION	VARIABLES	POBLACION Y MUESTRA
<p>¿Cumplirá el criterio de calidad establecido en USP 38 la evaluación microbiológica en Clindamicina inyectable de 600mg marca Sanderson S.A evaluados durante el periodo Octubre a Diciembre del 2015?</p> <p>Problemas Específicos</p> <p>P.E.1: ¿La prueba lisado de amebocito de <i>Limulus</i> presentara sensibilidad a la máxima dilución valida (MDV)?</p> <p>P.E.2: ¿Cuál será la concentración, en Unidades USP de endotoxina por mg (UE/mg) en Clindamicina inyectable?</p> <p>P.E.3: ¿Cuál será la cantidad de endotoxinas bacterianas en Clindamicina inyectable de 600mg de acuerdo a lo establecido en USP 38?</p> <p>P.E.4: ¿Cuál será la dilución máxima que presentara interferencia?</p>	<p>Determinar si la calidad microbiológica de Clindamicina inyectable de 600mg mediante la prueba LAL aprueba el criterio establecido en USP 38</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>O.E.1: Determinar la máxima dilución valida (MDV) para la sensibilidad en la prueba lisado de amebocito de <i>Limulus</i> en Clindamicina inyectable</p> <p>O.E.2: Determinar la concentración de endotoxinas, en Unidades USP de endotoxina por mg (UE/mg) en Clindamicina inyectable</p> <p>O.E.3: Cuantificar la cantidad de endotoxinas en Clindamicina inyectable de 600mg de acuerdo a lo establecido en USP 38.</p> <p>O.E.4: Determinar la interferencia a la máxima dilución .</p>	<p>La calidad microbiológica de Clindamicina inyectable de 600 mg mediante la prueba LAL cumpliría el criterio establecido en USP 38</p> <p>Hipótesis Específicas</p> <p>H.E.1: La muestra de Clindamicina inyectable establecería la dilución 1:2900 como máxima dilución valida (MDV) para la sensibilidad de la prueba lisado de amebocito de <i>Limulus</i>.</p> <p>H.E.2: La concentración de endotoxinas en Unidades USP de endotoxina por mg (UE/mg) en Clindamicina inyectable se encuentra dentro del rango según lo establecido en USP38.</p> <p>H.E.3: La cantidad de endotoxinas en Clindamicina inyectable de 600mg se encuentra dentro del rango según lo establecido en USP38.</p> <p>H.E.4.: La dilución 1:64 de la muestra de Clindamicina inyectable establecería la ultima dilución que presenta interferencia para la prueba de lisado de amebocito de <i>Limulus</i>.</p>	<p>Tipo de Investigación:</p> <p>- Aplicativo</p> <p>Nivel de Investigación:</p> <p>-Descriptivo</p>	<p>Método de Investigación</p> <p>:</p> <p>-inductivo</p>	<p>Variable independiente (Y)</p> <p>Y: Calidad microbiológica de Clindamicina inyectable de 600mg</p> <p>Indicadores:</p> <p>Y1: Unidades de endotoxina por mg</p> <p>Y2: Unidades de endotoxina por ml</p> <p>Y3: Por encima del valor establecido en USP 38</p> <p>Y4: Por debajo del valor establecido en USP 38</p> <p>Variable dependiente (X)</p> <p>X: La Prueba LAL</p> <p>Indicadores:</p> <p>X1: Visualización de gelificación</p>	<p>Población:</p> <p>La población de la investigación está constituida por todas las muestras de ampollas de Clindamicina 600mg/4ml de la marca Sanderson S.A que se expenden en la farmacia del hospital nacional Guillermo Almenara Irigoyen en el periodo de octubre a diciembre de 215</p> <p>Muestra:</p> <p>Se recolecta 40 ampollas de 600mg/4ml de la serie 75IG1328 marca Sanderson S.A .</p>







Laboratorio Autorizado por el INSTITUTO NACIONAL DE SALUD con Resolución N° 029-2015-CNCC/INS

Informe de Ensayo N° 108785/2016

DATOS DEL CLIENTE

Solicitante : PAMELA ACUÑA VILA
Domicilio Legal : ---
Contacto : ---
Dirección de Entrega : ---

DATOS DEL PRODUCTO

Producto : CLINDAMICINA 600mg/4mL
D.C.I : CLINDAMICINA
Forma Farmaceutica : Solución Inyectable
Via de Administracion : IM, IV
Registro Sanitario : EG-5152
Laboratorio Fabricante : Lab. Sanderson S.A.
Importado por : ---
Ensayos Realizados en : NSF INASSA S.A.C.
Av. La Marina N° 3035 San Miguel, Lima - Perú
Fecha de Recepción : 2016-01-12
Fecha de Inicio de Análisis : 2016-01-14
Fecha de Término de Análisis : 2016-01-18
Referencia : ---
Procedencia : Muestra proporcionada por el Cliente

DATOS DE LA MUESTRA

Identificación	Cantidad	Descripción / Presentación	Precinto	FV	M
Lote: 75IG1328	40 unidades	Ampolla de vidrio incoloro pirograbado x 4 mL	---	2017-07	0160031-001

DATOS DEL SERVICIO

ANÁLISIS	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Endotoxinas Bacterianas (1)	< 0,58 Unidades USP Endotoxinas / mg de Clindamicina.	No más de 0,58 unidades USP de Endotoxinas / mg de Clindamicina.

REFERENCIA TÉCNICA:

(1) USP 38

CONCLUSIÓN:

LA MUESTRA ANALIZADA **ES CONFORME** CON LAS ESPECIFICACIONES SEGÚN LA USP 38 CLINDAMICINA 600mg/4mL SOLUCIÓN INYECTABLE, LOTE: 75IG1328; PROPORCIONADO POR EL CLIENTE PARA LOS ANÁLISIS ARRIBA INDICADOS.

NSF INASSA S.A.C.



Q.F. Maritza Iglesias Galiano
Director Técnico de Fármacos
C.Q.F.P. N° 01280

BGG
Lima, 18 de Enero del 2016



LABORATORIO DE FARMACIA

Forma: LF-006

Edición: 4 ta

PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANAS

Referencia: LF-80-002

Página: 1 de 1

PRODUCTO: CLINDAMICINA 600 mg - 4mL

LOTE: 75IG1328 F. Exp: 07/2017

ORDEN DE TRABAJO: 00203549 FECHA DE ANALISIS: 14/01/2016

M (CODIGO DE MUESTRA): 160031001 HORA DE ANALISIS: 17:15H

CANTIDAD DE MUESTRA: 40 unidad

PRESENTACION: Ampolla Viales Fco Jarra prellenada

METODO: USP 38 <85> PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS - TÉCNICA DE COAGULACIÓN - Prueba de Limite

BP 2015

CÁLCULO DEL MDV / DILUCIONES DE TRABAJO

CÁLCULO DEL MDV (Máxima dilución válida)			
Concentración del producto / Unidades de device utilizados	Volumen diluyente / Volumen de Lavado	Limite de endotoxina	Sensibilidad del reactivo LAL (λ)
800mg /4mL	-----	< 0.58	0.03

$$MDV = \frac{[Producto] \times Limite de endotoxina}{\lambda}$$

MDV	2,900.00
-----	----------

Cálculo de las diluciones de trabajo

Muestra (μL)	100	100	100	-----
Agua LAL (μL)	900	900	900	-----
Dilución	1 en 10	1 en 100	1 en 1000	---

TRAZABILIDAD DEL ENSAYO

Reactivo	Lote	Fecha de Expiración	Sensibilidad / Potencia
Reactivo LAL (Limulus amoebocyte lysate)	514-07-696	04 AGO 2019	0.03
Buffer Glucashield	1207039	28-ago-17	
Control Estándar de Endotoxina (CSE)	145	16-jul-18	10 EU/ ng /5mL
Agua LAL (LWR)	AZJ193274	sep-17	
Equipos/Materiales		Código	Certificado de Calibración / Fecha de expiración
Estufa	FAR 303		TC-0835-2015
Baño María 37°C +/- 1°C	B-202		TC-0507-2015
Flujo Laminar	B-409		2015813
Micropipeta 100- 1000μL	FAR-288		MV-1640-2015
Micropipeta 20 - 200μL	FAR-298		MV-1810-2015
Cronómetro	B-795		LTF -058-2014
Tubos despirogenados	200048		01-may-17
Cabina de Bioseguridad	FAR 0000271		
pHmetro	FAR -0000338		163- HL

Aptitud del Producto (Pruebas de Factores de Interferencias)	
Nº Protocolo	002_2016
FECHA	14/01/2016
DILUCIÓN	1 en 1000
VOLUMEN DE RECONSTITUCIÓN	-----

Confirmación de la sensibilidad (Limulus amoebocyte lysate)	
Nº Protocolo	150
FECHA	19/10/2015

pH muestra	7.26
	7.28

PRUEBA LIMITE DE COAGULACION

PRUEBA LIMITE DE COAGULACIÓN						RESULTADOS	
Réplicas	A (Muestra)	B (Muestra / 2 λ de CSE)	C (2 λ de CSE/Agua LAL)	D (Agua LAL)	E (Material)	Cantidad de Endotoxina	Unidades
1	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	< 0.58	Unidades USP Endotoxinas / mg de clindamicina
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)		

OBSERVACIONES: Fecha y Hora de Termino del ensayo : 14/01/2016 18:30 Hrs

Fecha de Reporte: 2016-01-18

QF. Brianda Tolentino

Firma del Analista

QF. Karin Coz Martel

Firma del jefe de LF

NSF INASSA S.A.C.

NSF INASSA S.A.C.

LIC. WILBER YANALDO WILMA
C. 123456789
ASISTENTE MICROBIOLOGIA

QF. BRIL SOTO PEREZ
C. 123456789
ASISTENTE MICROBIOLOGIA

Informe Técnico N° 002/ 2016

De : Lic. Wilber Yataco Saravia

Fecha : 18 de Enero 2016

Asunto : CUANTIFICACION DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS -
OTR 00203549

1. MÉTODO DE ENSAYO

USP 38 <85> PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS -TECNICA DE COAGULACION -Prueba Cuantitativa

2. MUESTRA

Clindamicina ampolla Lote: 75IG1328 Exp 07/2017
OTR 00203549

3. OBJETIVO DEL ENSAYO

Determinar la concentración de Endotoxinas bacterianas presentes en la muestra

4. RESULTADOS OBTENIDOS

Item	Diluciones de trabajo											
	1	1/2.	1/4.	1/8.	1/16.	1/32.	1/64.	1/128.	1/256.	1/512.	1/1024.	1/2048.
Muestra	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Control Positivo	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

5. CONCLUSIONES

La sensibilidad del reactivo LAL fue de 0.03 UE / mL

La concentración de endotoxinas cuantificada en la muestra fue de:

Menor de 0.24 Unidades USP de Endotoxinas en la dilución de prueba, debido a que la dilución de prueba mínima encontrada fue 1 en 8.

Atentamente,



Wilber Yataco Saravia | *Senior Microbiologist, Pharmaceutical*
wyataco@nsf.org | (511) 616-5200 ext. :250 | Cel: (51) *rpc* : 984-397-086 |
NSF | Av. La Marina, 3035 | San Miguel | Lima | Peru
www.nsf.org | www.inassagroup.com.pe | www.envirolabperu.com.pe | www.servisanea.com.pe

Handwritten signature
NSF S.A.C.
C.C. WILBER YATACO SARAVIA
ASISTENTE MICROBIOLÓGICO



LABORATORIO DE FARMACIA

Forma: LF-079

Edición: 1ra

HOJA DE TRABAJO

Referencia: DF-40-002

Página: 1

PRODUCTO: Clindamicina 600mg/4mL.
 LOTE: 75IG1328 / F. Exp: 2017/07.
 ORDEN DE TRABAJO: 00203549
 M (CODIGO DE MUESTRA): 00160031001
 FECHA DE INGRESO: 2016-01-12.

Prueba de Endotoxinas (Cuantitativa).

Cantidad recibida: 20 ampullos.
 Cantidad procesada: 40 ampullos.
 Método: USP 38.
 Técnica: Coagulación (Gel clot)
 Área Trabajo: Farmacia.
 Especificación del Producto: < 0,58 UE / mg.

tiempo incubación: 16:00
 hora término: 17:15
 Fecha de Trabajo: 2016-01-15.
 N° protocolo: 552/2013.
 T° trabajo: 37°C ± 1°C x h 15'
 pH: 7,29 / 7,29.

MATERIALES	LOTE MEDIO	F. Expiración SETE Anticorrosión
Linulus Anagnostel.	514-07-676	2019-07-04
Agua LAL	A2J193274	2017-07.
Tubos despijados endotoxina	200048	2017-05-01.
Vol. reconst. al stock	5mL	2018-02-16.
Glucoschild	1207040	-
		2017-07-18.

Dilución	Replicación 1	Replicación 2	Control positivo
Primo	-	-	-
1/2	-	-	-
1/4	-	-	-
1/8	-	-	+
1/16	-	-	+
1/32	-	-	+
1/64	-	-	+
1/128	-	-	+
1/256	-	-	+
1/512	-	-	+
1/1024	-	-	+
1/2048	-	-	+

$$MDV = \frac{600 \times 0,58}{4} = 2900$$

Control Material: -/-
 Control Positivo: +/+
 Control H2O LAL: -/-

Resultado: $8 \times 0,103 = 0,24 \text{ UE/mg.}$

Conclusion: Resultado de 0,24 UE/mg no se puede determinar, porque hay interferencia por parte de la muestra.

15.01.2016 09:22:46
 inoLab pH 7310P
 No. serie 15290921

pH 7.29 23.9 °C. AR, +++

15.01.2016 09:23:54
 inoLab pH 7310P
 No. serie 15290921

pH 7.29 24.0 °C. AR, +++

Fecha de Reporte: 2016/01/19
 día/mes/año

NSF INASSA S.A.C.
 O.F. BRIANDA TOLENTINO LAVADO
 ANALISTA

Firma del Analista

NSF INASSA S.A.C.
 L.V. WILBER YATACO SARAVIA
 ASISTENTE MICROBIOLOGIA

Firma del jefe del LF



LABORATORIO DE FARMACIA

Forma: LF-073

Edición: 1ra

HOJA DE TRABAJO - PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA

Referencia: LF-80-002

Página: 1

PRODUCTO: Clindamicina 600mg/4ml.
 LOTE: #SIG1328 | F. Exp: 2017/07.
 ORDEN DE TRABAJO: 00203549
 M (CODIGO DE MUESTRA): 00160031001
 FECHA DE INGRESO: 2016-01-12.

Cantidad recibida: 40 ampollas.
 Cantidad procesada: 40 ampollas.
 Método: USP 38.
 Técnica: Coagulación (Gel clot)
 Volumen Reconstitución: -
 Area de Trabajo: Farmaco.
 Dilución de Trabajo: 1/1000
 Especificación del Producto: < 0,58 UE/mg.

Hora Incubación: 17:15.
 Hora de término: 18:30
 Fecha de trabajo: 2016-01-14
 Nº Protocolo: 557/2013. /002-2016 ✓
 Tº Trabajo: 37°C ± 1°C x 1h 15
 pH: 7,26 / 7,28.

Materiales	Lote Medio de Cultivo, Materiales, Reactivos	Lote autoclavado
Limulus Amenocyte lysate	514-07-676	2019-08-04
Buffer	-	-
Agua LAL	A2J193274	2014-07
Tubos despirogenados	200048	2017-05-01
Estandar endotoxina	145	2018-07-16
Volumen Reconstitución del estandar	5ml	-
GlaxoSmithKline	1207037	2019-08-28

Determinación del MDV

MDV: $\frac{600 \times 0,58}{4} = 2900$
 $\frac{2900}{0,03}$

Diluciones de trabajo

100	100	100	-
500	400	400	-
1/12	1/12	1/1000	-

RESULTADOS:

	Replica 1	Replica 2	RESULTADO
Muestra	-	-	< 0,58 UE/mg.

Control Durante la Prueba

	Replica 1	Replica 2
Control Material	-	-
Control Positivo 2λ	+	+
Control Agua LAL	-	-
Control Muestra + estandar 2λ	+	+

14.01.2016 14:56:07
 inoLab pH 7310P
 No. serie 15290921

pH 7.26 23.6 °C, AR, +++

14.01.2016 14:57:14
 inoLab pH 7310P
 No. serie 15290921

pH 7.28 23.6 °C, AR, +++

NSF INASSA S.A.C.

D.F. BRIGANDA TOLENTINO LAVADO ANALISTA

Firma del Analista

NSF INASSA S.A.C.

D.F. VALBER YAJALO ANALISTA

Firma del jefe del

Fecha de Reporte:

2016/01/13

año/mes/día