

Lisado de amebocitos de *Limulus*

PYROTELL®-T

Fabricado por:  <small>124 Bennett F. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA</small>	Teléfono: (508) 540-3444 Número gratuito: (888) 395-2221 Fax: (508) 540-8680 Soporte técnico: (800) 848-3248 Servicio de atención al cliente: (800) 525-8378
PN000845-es rev6 Abril 2017	

Para la detección y cuantificación de endotoxinas bacterianas gramnegativas (Lipopolisacáridos)

El reactivo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) Pyrotell®-T está indicado para la detección y cuantificación *in vitro* de endotoxinas en el análisis de los productos finales de los medicamentos inyectables para humanos (incluidos productos biológicos), los medicamentos inyectables para animales y de los productos sanitarios. También puede utilizarse para analizar materias primas (incluida el agua) y los componentes utilizados en la producción y para la supervisión periódica durante la prueba de los niveles de endotoxinas. El análisis de endotoxinas bacterianas de la USP (1) es el análisis oficial al que remiten las monografías específicas de la USP. Utilice Pyrotell®-T solo para fines de diagnóstico *in vitro*. Pyrotell®-T no está indicado para la detección de endotoxinas en muestras clínicas ni para el diagnóstico de enfermedades en humanos o animales.

Resumen del análisis

El lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) procedentes del cangrejo herradura, *Limulus polyphemus*. En presencia de endotoxinas, el LAL se vuelve turbio y, bajo las condiciones adecuadas, forma un coágulo de gel sólido. El análisis de LAL turbidimétrico se realiza añadiendo un volumen dado de Pyrotell®-T a un volumen dado de muestra e incubando la mezcla de reacción a 37 °C. Cuanto mayor sea la concentración de endotoxinas en la muestra, se desarrollará con mayor rapidez turbidez. La turbidez se puede utilizar para cuantificar la concentración de endotoxinas de dos formas.

En el método de LAL turbidimétrico cinético, se determina la velocidad de aumento de la turbidez o el tiempo tardado en alcanzar un determinado nivel de turbidez (el tiempo de aparición). Mayores concentraciones de endotoxinas generan tiempos de aparición más cortos. El ensayo requiere instrumental especializado para incubar múltiples muestras a una temperatura controlada (habitualmente 37 °C) y tomar lecturas de densidad óptica a intervalos regulares. Se pueden construir curvas estándar representando en un diagrama el tiempo de aparición logarítmico en comparación con la concentración logarítmica de la endotoxina estándar y se utilizan para calcular las concentraciones de endotoxinas en las muestras.

El método de LAL turbidimétrico es rápido, específico, fácil de realizar y sumamente sensible. El límite de detección depende del método y el instrumental utilizado y puede ser tan bajo como 0,001 unidades de endotoxinas (UE) por ml.

Historia y principio biológico

Howell describió la coagulación de la sangre de *Limulus* en 1885 (2). En la década de 1950, Bang en el Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA (EE. UU.), descubrió que las bacterias gramnegativas provocan que la sangre de *Limulus* se coagule (3). Levin y Bang determinaron más tarde que la reacción es enzimática y que las enzimas se localizan en gránulos en los amebocitos (4). Demostraron que la coagulación inicia un componente estructural exclusivo de la pared celular bacteriana llamado endotoxina o lipopolisacárido (5). Los conocimientos actuales incluyen que la reacción consta de una cascada de pasos de activación enzimática. Aunque no se comprende la reacción por completo, el último paso se ha descrito bien. La proteína de coagulación (coagulogen) se escinde mediante la enzima de coagulación activada; los productos insolubles de la escisión se fusionan mediante la interacción iónica y la turbidez de la mezcla de reacción aumenta. Cuanto mayor sea la cantidad de endotoxina presente, con mayor rapidez se desarrollará la turbidez. En la literatura profesional está disponible más información sobre la reacción del LAL y las aplicaciones (6, 7).

Reactivo

Pyrotell®-T se envasa en forma liofilizada. Pyrotell®-T contiene un extracto acuoso de amebocitos de *L. polyphemus*, albúmina sérica humana (estabilizador), NaCl (cloruro sódico) y otros iones adecuados. No se añaden conservantes ni amortiguadores.

Pyrotell®-T no se etiqueta con una sensibilidad específica. La sensibilidad de una prueba dada (designada λ) es la concentración de endotoxinas más baja utilizada para construir la curva estándar. En el Pyros Kinetix Flex® (Associates of Cape Cod, Inc.) el límite de detección y, por tanto, el valor mínimo posible de λ , es 0,001 UE/ml.

No se ha determinado la toxicidad de este reactivo; por tanto, debe tenerse precaución al manipular Pyrotell®-T.

Reconstituya Pyrotell®-T del modo siguiente:

1. Golpee suavemente el vial de Pyrotell®-T para provocar que el LAL suelto se vaya al fondo. Rompa el vacío levantando el tapón gris. No contamine la boca del vial. Retire y deseche el tapón; no inyecte a través del tapón ni lo reutilice. Una pequeña cantidad de LAL en el tapón no afectará al análisis.
2. Reconstituya Pyrotell®-T con agua con reactivo LAL (LAL Reagent Water o LRW, consulte a continuación) o un amortiguador compatible (disponible de Associates of Cape Cod, Inc.). Añada 5 ml según se indique en la etiqueta del vial. Una vez que se disuelva el reactivo, renueve suavemente el vial realizando movimientos circulares para asegurar la homogeneidad. Mezclar con demasiada intensidad puede generar la formación de demasiada espuma, que puede provocar una pérdida de sensibilidad. Cubra el vial con Parafilm M® (Bemis Company Inc.™) cuando no esté en uso.

Condiciones de conservación

Pyrotell®-T liofilizado es relativamente termoestable y, si se mantiene refrigerado, conservará la actividad completa hasta la fecha de caducidad de la etiqueta. Conserve el producto entre -20 y +8 °C. Las temperaturas por debajo de -20 °C pueden encoger el tapón, generando una posible pérdida del vacío y la contaminación de Pyrotell®-T. Las temperaturas superiores a 37 °C pueden provocar un rápido deterioro de Pyrotell®-T liofilizado como evidencia la pérdida de sensibilidad y un amarilleamiento notorio del producto. Pyrotell®-T se envía con gel refrigerante en recipientes aislados para protegerlo de las temperaturas elevadas.

Pyrotell®-T reconstituido es habitualmente transparente y ligeramente opalescente. Un lote ocasional presentará una ligera turbidez uniforme. La presencia de pequeñas fibras o hebras no indica contaminación ni afecta a la actividad; sin embargo, la precipitación floculante o un color amarillo notorio indican deterioro.

Pyrotell®-T reconstituido es menos estable que el producto liofilizado; los viales se pueden mantener durante un máximo de 24 horas entre 2 y 8 °C. Pyrotell®-T reconstituido se puede congelar una vez. Conservará la actividad durante tres meses si se congela inmediatamente después de la reconstitución y se mantiene a -20 °C o a una temperatura inferior. Después de descongelarlo, se aplican los mismos criterios visuales de calidad que para la reconstitución inicial.

Recogida y preparación de las muestras

Las muestras se deben recoger de forma aseptica en recipientes apirógenos. Se recomienda material de vidrio reutilizado y despirogenado o material de plástico de poliestireno estéril y desechable, con el objetivo de minimizar la adsorción de endotoxinas por las superficies del recipiente. No todos los recipientes de plástico están libres de endotoxinas detectables y una sustancia extraíble de algunos tipos puede interferir con el análisis de LAL. El uso del amortiguador Pyrosol® con frecuencia superará la variación que se aprecia como consecuencia de la interferencia generada por los consumibles. Se puede analizar la aceptabilidad de los instrumentos de laboratorio, seleccionando al azar recipientes de un lote, enjuagándolos con un pequeño volumen de LRW a temperatura ambiente durante una hora y analizando el enjuague como una muestra. El enjuague debe contener significativamente menos endotoxinas que la menor concentración estándar a utilizar. Además, el enjuague no debería inhibir ni intensificar el análisis, algo que se determinará mediante la recuperación de una cantidad conocida de endotoxina añadida.

El pH de la mezcla de reacción debe estar entre 6 y 8. Ajuste el pH de la muestra con HCl, NaOH o amortiguador (libre de endotoxina detectable). Diluya el HCl o NaOH concentrado con LRW y utilice dentro de unos límites normales que no generarán una dilución importante de la muestra del análisis. Si se forma un precipitado en la muestra con el ajuste del pH, diluya la muestra (no supere la dilución válida máxima o DVM – consulte «Limitaciones del procedimiento») antes de ajustar el pH. Alternativamente, reconstituya Pyrotell®-T con un amortiguador compatible (disponible de Associates of Cape Cod, Inc.) y compruebe el pH de la mezcla de reacción. No ajuste el pH del agua o la solución salina no amortiguada. Tenga en cuenta que la dilución por sí sola puede superar los problemas del pH.

Sustancias que desnaturalizan proteínas, quelan iones, se unen a endotoxinas o alteran el estado hidrofóbico de las endotoxinas, pueden interferir con el análisis. La interferencia se puede detectar como una recuperación de endotoxina significativamente superior o inferior a la prevista, cuando se añada una cantidad conocida de endotoxina estándar a la muestra (consulte «Limitaciones del procedimiento»). En la mayor parte de los casos, la dilución de la muestra reducirá la concentración y la actividad de las sustancias interferentes y seguirá ofreciendo resultados válidos de análisis. Los esquemas de dilución y los controles adecuados se comentan en «Procedimiento del análisis».

Las muestras se deben analizar lo antes posible después de la recogida. Puede ser aconsejable congelar muestras no estériles que se conservarán o enviarán antes del análisis. Las muestras que se espere que contengan bajas concentraciones de endotoxina (menos de 1 UE/ml) deben analizarse para comprobar una posible pérdida de endotoxina durante la conservación.

Procedimiento del análisis

Reactivos de análisis

1. Pyrotell®-T (consulte la descripción y el método de reconstitución anteriores).
2. Agua con reactivo LAL (LRW), no se suministra con Pyrotell®-T; se pide por separado. Pyrotell®-T liofilizado se debe reconstituir con agua (o amortiguador compatible disponible de Associates of Cape Cod, Inc., consulte el punto 3 a continuación) que no muestre ninguna endotoxina detectable en el análisis de LAL. Las fuentes de agua recomendadas incluyen a Associates of Cape Cod, Inc. o cualquier agua estéril para inyección de la USP disponible comercialmente sin bacteriostático o agua para irrigación de la USP. Cualquiera de estas se puede utilizar, siempre que hayan demostrado ser aceptables para usarse como LRW. El límite de endotoxina para el agua estéril para inyección de la USP es de solo 0,25 UE/ml; por tanto, el agua estéril para inyección puede contener endotoxinas detectables y no ser adecuada para su uso.

Para certificar que el agua sea aceptable como LRW, analícela como una muestra con un control de producto positivo (consulte el punto 1.c. de la sección «Controles»). Utilice LRW certificada para reconstituir Pyrotell®-T, para realizar diluciones de los estándares y preparar controles positivos (consulte los puntos 1.a. y 1.b. de «Controles»). Construya una curva estándar de los tiempos de aparición de los estándares. El coeficiente de correlación debe ser, al menos, 0,980 (valor absoluto). La concentración de endotoxinas del agua analizada se puede estimar mediante la extrapolación de la curva estándar bajo la concentración mínima de endotoxinas y debe ser inferior al estándar más bajo. Además, la concentración de endotoxinas del control de producto positivo debe estar comprendida entre el 50 % y el 200 % de la concentración normal de la endotoxina añadida.

3. Amortiguador, no suministrado con Pyrotell®-T; pida por separado en caso necesario. El amortiguador Pyrosol (N.º de ref. BC051 o BC554) o el amortiguador Glucashield™ (N.º de ref. GB051) se pueden usar en lugar de LRW para reconstituir Pyrotell®-T para ayudar a superar un problema de pH de la muestra, una interferencia de consumible o una interferencia como consecuencia de los glucanos.
4. Endotoxina estándar, no suministrada con Pyrotell®-T; pedir por separado. La endotoxina estándar de control (EEC), obtenida de Associates of Cape Cod, Inc., se utiliza para construir las curvas estándar, validar el producto y preparar los controles de inhibición. Cada vial contiene un peso medido de endotoxina. El estándar de referencia de la endotoxina de la USP se puede obtener de U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Siga las indicaciones del fabricante para la reconstitución y conservación de las endotoxinas estándar. Los lotes de EEC pueden mostrar potencias diferentes (UE/ng) cuando se analizan con lotes distintos de Pyrotell®-T. Si se utiliza una EEC, las concentraciones de endotoxinas se pueden expresar en UE/ml si la potencia de un lote dado de EEC se ha determinado con el lote de Pyrotell®-T en cuestión (1, 2).

Materiales y equipos (no suministrados)

1. Recipientes de reacción. La elección del tipo depende del instrumental utilizado para medir la turbidez. Los tubos de reacción del sistema Pyros Kinetix Flex son tubos de vidrio de borosilicato despirogenados de 8 x 75 mm (TK100).
2. Lector óptico. Para el método turbidimétrico cinético, se recomienda el uso de un lector óptico de incubación como el Pyros Kinetix Flex o el BioTek ELx 808 IU disponible de Associates of Cape Cod, Inc.

3. *Gradillas para tubos de ensayo* para sujetar y/o incubar tubos de reacción.
4. *Pipetas*, pipetas automáticas con puntas de pipeta o pipetas de repetición con cuerpos de jeringuilla de plástico. Se recomiendan puntas y pipetas desechables libres de glucanos y endotoxinas interferentes. Associates of Cape Cod, Inc. ofrece la línea Pyroclear®, que se distribuye con un Certificado de cumplimiento que garantiza que los productos están libres de glucanos y endotoxinas interferentes.
5. *Agitadora tipo vorticial*.
6. *Parafilm M®*. El lado en contacto con el papel protector es habitualmente apirógeno.
7. *Tubos de ensayo apirógenos* con adecuada capacidad para realizar diluciones de muestras de análisis o estándar de endotoxina. Consulte «Recogida y preparación de las muestras» para conocer otros recipientes adecuados para diluciones.
8. *Horno de aire caliente* con capacidad de 250 °C para despirogenación de materiales de vidrio. Los ajustes mínimos de tiempo y temperatura utilizados habitualmente son 30 minutos a 250 °C (1,8,9).

Controles

Los controles son necesarios para asegurar un análisis válido. Los procedimientos recomendados se detallan en la USP (1).

1. Controles de endotoxinas

- a. **Serie estándar de endotoxinas.** Prepare un conjunto nuevo de diluciones a partir de las existencias de solución de endotoxinas para cada análisis. No utilice diluciones preparadas previamente a menos que haya demostrado la estabilidad del rango de concentraciones. Realice diluciones en series geométricas (p. ej., diluciones dos, cuatro o diez veces superiores) para conseguir el rango de concentraciones de endotoxinas necesario. Se recomiendan concentraciones de 1,0, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 y 0,03125 UE/ml para verificar el rendimiento de Pyrotell®-T. La concentración de endotoxinas mínima en cualquier serie estándar es el límite de detección de ese análisis particular y se designa como λ . Para conseguir el rango de estándares necesario, utilice el menor número de diluciones posible con volúmenes de pipeta adecuados, para maximizar la exactitud.
- b. Se debe incluir un **control positivo** (una concentración de endotoxina estándar individual) si la serie estándar (consulte a. más arriba) no se prepara del mismo modo que los controles de producto positivos (consulte c.). Una concentración de 4λ resulta adecuada para curvas estándar construidas a partir de 4, 5 o 6 diluciones dos veces superiores de endotoxina estándar (p. ej., $4\lambda = 0,125$ UE/ml en la serie estándar proporcionada en la sección a. anterior). En situaciones en las que el incremento de la dilución es superior al doble, la concentración del control positivo debe ser igual a la de un estándar del medio de la curva estándar. Por ejemplo, un valor de 0,1 UE/ml sería adecuado para controles positivos incluidos con una serie estándar que consta de concentraciones de 0,001, 0,01, 0,1 y 1,0 UE/ml. Si una serie estándar no está incluida en un análisis, debe incluirse un control positivo para verificar que sea adecuado usar los parámetros de una curva estándar anterior para calcular las concentraciones de endotoxinas. Consulte las directrices de la FDA (1) y la Orientación provisional (2) de Análisis de rutina de medicamentos (o dispositivos) mediante el análisis de LAL, para obtener detalles.

- c. Los **controles de producto positivos** son controles de inhibición/realce y constan de la muestra o la dilución de la muestra a la que se añade la endotoxina estándar. La concentración de la endotoxina añadida en la muestra de análisis debe ser la misma que la del control positivo. Consulte la sección b. anterior para la selección de la concentración de endotoxina adecuada para el control de producto positivo. La endotoxina añadida se conoce frecuentemente como «spike».

2. Controles negativos

Los controles negativos de LRW se deben incluir con cada análisis.

Preparación de la muestra - Determinación de la dilución del análisis

Si se ha desarrollado previamente un protocolo de análisis para el tipo de muestra a analizar, realice la dilución necesaria para el ensayo y proceda del modo indicado en «Realización del análisis» a continuación. Si no se ha desarrollado un protocolo para el tipo de muestra, realice una serie de diluciones de la muestra diez veces superiores. No supere la dilución válida máxima (DVM) del producto en más de un factor de 10. [Consulte «Limitaciones del procedimiento» a continuación o a la USP (1) para obtener una explicación y determinar el cálculo de la DVM].

Prepare diluciones adecuadas de todas las muestras con un control de producto positivo para cada una.

Realización del análisis

Es necesaria una **técnica uniforme** para obtener resultados satisfactorios. Todos los controles y muestras se deben analizar (al menos) por duplicado.

1. Prepare el instrumental para el análisis, según sea necesario. En un sistema automatizado esto implica habitualmente introducir descriptores de la muestra y establecer parámetros de análisis de la muestra.
2. Añada el volumen adecuado de muestra (control negativo, endotoxina estándar, muestra, control positivo o control de producto positivo) al tubo de reacción o microplaca. Para una relación 1:1 en el Pyros Kinetix Flex use 0,1 ml; para una relación 1:4 en el Pyros Kinetix Flex, use un volumen de 0,2 ml o 0,4 ml.
3. Añada Pyrotell®-T según sea adecuado para el procedimiento. En el caso de métodos que utilicen tubos de reacción individuales, el momento de la reacción en cada tubo resulta esencial. A cada uno de los tubos de reacción, añada Pyrotell®-T, mezcle durante unos 2 segundos y coloque el tubo en el lector óptico de incubación. El volumen de Pyrotell®-T añadido es 0,1 ml para el método de la relación 1:1 del Pyros Kinetix Flex, y la mayor parte de los demás métodos. Para la relación 1:4 del Pyros Kinetix Flex, si el volumen de la muestra es 0,4 ml, añada 0,1 ml de LAL. Si se utiliza un volumen de muestra de 0,2 ml, resulta adecuado un volumen de 0,05 ml de LAL. Una causa habitual de análisis insatisfactorios es no mezclar de forma adecuada. La forma más cómoda de añadir Pyrotell®-T es usar una pipeta de repetición. Se recomienda una pipeta o punta de pipeta nueva para cada introducción en el vial de Pyrotell®-T. Es posible que para otros protocolos de análisis resulten adecuados distintos volúmenes de Pyrotell®-T.
4. Una vez que haya comenzado la incubación, no altere el tubo o tubos de reacción. La mesa de laboratorio que soporta al lector óptico/incubador debe estar libre de vibraciones excesivas.

5. Lea el análisis. Deje que el análisis se ejecute hasta que todas las muestras se hayan incubado durante más tiempo del necesario para que la concentración de endotoxina estándar más baja alcance la densidad óptica (DO) de aparición. Los sistemas de análisis automatizados terminarán habitualmente el análisis después de un período preestablecido.

Resultados

1. Cálculos preliminares.

Determine el tiempo que tardan las muestras en alcanzar un umbral de densidad óptica particular (habitualmente 0,02 unidades de DO en un lector de turbos) después de que se haya realizado cualquier corrección de datos. Las lecturas de densidad óptica deben ponerse en relación con una lectura inicial tomada como 0 unidades de DO. El software del sistema hará esto. El tiempo que se tarda en alcanzar el valor de DO se llama **tiempo de aparición**.

2. Construir una curva estándar.

Construya una curva estándar mediante una regresión lineal del tiempo de aparición logarítmico frente a la concentración de endotoxina logarítmica para los estándares. La ecuación de la línea de regresión describe la curva estándar (salvo que se tome la opción de usar una regresión polinomial, tal como se describe en el siguiente párrafo).

Siempre que el valor absoluto del coeficiente de correlación de la curva estándar sea al menos 0,980 (consulte el punto 2. de Interpretación, a continuación), puede usarse una ecuación de línea de regresión polinomial (es decir, cuadrática) para calcular las concentraciones de endotoxinas.

3. **Calcular las concentraciones de endotoxinas.** Calcule las concentraciones de endotoxinas de todas las muestras (incluidos los estándares y controles) utilizando la ecuación de línea de una línea recta:

$$Y = aX + b$$

donde:

Y = tiempo de aparición logarítmico

X = concentración de endotoxinas logarítmica

a = pendiente de la línea

b = la intersección de Y.

En el caso del modelo cuadrático, la ecuación es:

$$Y = a_1X + a_2X^2 + b$$

Donde a_1 y a_2 son las pendientes de X y X²

Estos cálculos los realiza habitualmente el software del sistema de análisis de endotoxinas.

Interpretación

1. Para que un análisis sea válido, la concentración de endotoxinas de los controles negativos (estimada mediante extrapolación de la curva estándar) debe ser inferior a la concentración estándar más reducida.
2. Cuando se incluye una curva estándar con el análisis, el valor absoluto del coeficiente de correlación de la curva estándar debe ser mayor o igual que 0,980.
3. La concentración de endotoxinas medida media de los controles positivos debe estar dentro del 25 % de la concentración nominal. Por tanto, si el control positivo es 0,125 UE/ml, la concentración medida debe estar entre 0,093(75) y 0,156(25) UE/ml.

4. Determine el rango medio de los tiempos de aparición de la curva estándar. Por ejemplo, si los tiempos de aparición de los dos duplicados de la mayor concentración de endotoxinas estándar son 1079 y 1087 segundos y los de la menor concentración son 1954 y 1968, el rango medio de los tiempos de aparición es de 1083 a 1961. Las concentraciones de endotoxinas válidas solo se pueden calcular para muestras con un tiempo de aparición medio englobado dentro del rango medio de tiempos de aparición de la curva estándar.

Por ejemplo, se puede obtener un resultado válido para una muestra desconocida que tenga tiempos de aparición de 1949 y 1965 (media = 1957), a pesar del hecho de que uno de los duplicados se encuentre fuera del rango estándar.

5. Para demostrar que la muestra no interfiere de forma significativa con la reacción LAL/endotoxina, la concentración de endotoxinas medida del control de producto positivo debe estar dentro del 50 al 200 % de la concentración nominal de la endotoxina añadida o 'spike'. Antes de determinar si la endotoxina añadida se recupera dentro de estos límites, sustraiga la concentración de endotoxinas medida en la muestra (sin endotoxina añadida). Por ejemplo, para ser considerada libre de interferencias significativas, la concentración de endotoxinas medida en un control de producto positivo de 0,125 UE/ml (después de la sustracción de cualquier endotoxina en la muestra sin endotoxina añadida) debe estar dentro del rango 0,0625 - 0,25 UE/ml (50 a 200 % de 0,125 UE/ml). Si la concentración de endotoxinas medida en la muestra sin endotoxina añadida es 0,028 UE/ml y la del control de producto positivo es 0,163 UE/ml, la endotoxina atribuible al «spike» es 0,163 - 0,028 = 0,135 UE/ml. Esto está dentro del rango, y sujeto a otros requisitos cumplidos, el análisis de la muestra es válido.

Limitaciones del procedimiento

El procedimiento está limitado por la capacidad de inhibición o realce de la muestra en virtud del análisis. Si el procedimiento no se puede validar (1) a una concentración de la muestra que sea superior a la concentración válida mínima (CVM), el análisis de LAL no se puede sustituir por el análisis de pirógenos de USP. La CVM es calcula del modo siguiente:

$$CVM = \frac{(\lambda) \text{ (dosis de la muestra)}}{\text{(límite de tolerancia de la endotoxina)}}$$

donde λ se expresa en UE/ml, la dosis de la muestra se expresa en unidades por kg de peso corporal y el límite de tolerancia de la endotoxina se expresa en UE/kg.

La dilución válida máxima (DVM) es la dilución de la muestra que contiene la CVM (1). Es la concentración de la muestra inicial dividida por la CVM.

El límite de tolerancia de la endotoxina de los medicamentos parenterales se especifica en las monografías individuales (1). El límite de los productos sanitarios se expresa en ml de un volumen de extracción o enjuague obtenido del modo descrito en la USP (10) sobre la base de los límites de los productos. En el caso de productos que no entran en contacto con líquido cefalorraquídeo, el límite es 20 UE/producto; para aquellos que sí lo contienen, es 2,15 UE/producto. El límite de los productos líquidos es el mismo que el de los medicamentos.

La tripsina provocará un resultado positivo falso salvo que se desnaturalice mediante un tratamiento térmico antes de realizar el análisis. Materiales como la sangre, el suero, la albúmina y el plasma pueden interferir con los ensayos turbidimétricos.

Valores previstos

La endotoxina en las muestras puede cuantificarse entre el rango de concentraciones de endotoxinas estándar utilizadas para construir la curva estándar. Si es necesario diluir la muestra para superar cualquier inhibición o realce, la cantidad mínima de endotoxina que pueda detectarse se incrementará en consecuencia. Los materiales derivados de fuentes biológicas, incluso después de una purificación bioquímica, pueden seguir conteniendo niveles medibles de endotoxina. El agua obtenida mediante destilación, ósmosis inversa o ultrafiltración puede contener menos endotoxina que la detectable, siempre que el proceso de purificación se realice correctamente y el agua no se contamine después de la producción.

Bibliografía

1. Bacterial Endotoxin Test, chapter <85> United States Pharmacopeia (current version), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
2. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
3. Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol. Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
4. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
5. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
6. Levin, J., and F. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
7. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.
8. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:710-714.
9. Sweet, B. H. and J. F. Huxsoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
10. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Nuestro experimentado personal estará encantado de comentar los aspectos prácticos y teóricos del análisis de LAL. Llame si tiene problemas utilizando Pyrotell®-T.

Para descargar una copia de las instrucciones de uso de Pyrotell®-T en diversos idiomas, visite [www. accuisa.com](http://www.accuisa.com)