

## Lisado de amebocitos de *Limulus*

### CHROMO-LAL

Fabricado por:



Teléfono: (508) 540-3444  
Línea gratuita: (888) 395-2221  
Fax: (508) 540-8680  
Asistencia técnica: (800) 848-3248  
Servicio al cliente: (800) 525-8378

Licencia estadounidense n.º 700

PN001087-es rev5 Octubre de 2019

#### LISADO DE AMEBOCITOS DE *LIMULUS* CHROMO-LAL

para la detección y cuantificación de endotoxinas bacterianas gramnegativas (lipopolisacáridos)

#### RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ANÁLISIS

En la década de 1950, Frederik Bang observó que la infección por bacterias gramnegativas provocaba coagulación intravascular en el *Limulus polyphemus*, el cangrejo herradura (1). Levin y Bang demostraron que la coagulación era causada por la activación de un número de enzimas presentes en las células sanguíneas (amebocitos) del *Limulus polyphemus*, y que esta activación la iniciaba la endotoxina (lipopolisacárido) de las paredes de las células bacterianas gramnegativas (2, 3, 4). El análisis cromógeno, introducido en 1977 (5, 6), es una modificación que permite medir la concentración de endotoxina en función de la intensidad del color en vez de en función de la turbidez o la gelación en la mezcla de reacción. Los resultados obtenidos con este método modificado suelen ser equivalentes a los obtenidos con el método del coágulo de gel o con el método turbidimétrico, dentro del intervalo de error de los análisis.

En el análisis Chromo-LAL, se mezclan 1:1 LAL coliofilizado y reactivo de sustrato con muestra de análisis en una microplaca, o equivalente, y se incuban en un lector a 37±1 °C. Las mediciones de absorbancia se registran junto con el tiempo transcurrido tras la adición de Chromo-LAL y se analizan con un software adecuado. Se calcula el tiempo (tiempo de comienzo) que tarda una muestra en alcanzar una absorbancia especificada (DO [densidad óptica] de comienzo) y, a continuación, se genera una curva estándar que muestra la correlación lineal entre el tiempo de comienzo logarítmico y la concentración logarítmica de endotoxina estándar. El rango máximo de concentraciones de endotoxina de la curva estándar es de 0,005 UE/mL - 50 UE/mL. La sensibilidad ( $\lambda$ ) del ensayo se define como la concentración más baja utilizada en la curva estándar. La sensibilidad máxima de este análisis es de 0,005 UE/mL.

#### PRINCIPIO BIOLÓGICO

El LAL contiene enzimas que son activadas en una serie de reacciones en presencia de endotoxina. La última enzima activada en la cascada divide el cromóforo, la

paranitroanilina (pNA), proveniente del sustrato cromógeno, produciendo un color amarillo.

Endotoxina

1. Proenzima → Enzima

Enzima

2. Sustrato cromógeno → Péptido + pNA

La cantidad de pNA liberado y medido fotométricamente a 405 nm es proporcional a la cantidad de endotoxina presente en el sistema. Cuanto mayor es la concentración de endotoxina, más rápida es la reacción.

#### REACTIVOS

Los reactivos sin abrir son estables a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del recipiente. Antes de la reconstitución, lleve los reactivos a la temperatura ambiente y golpee suavemente los viales que contengan el material liofilizado contra una superficie dura para hacer que el material suelto caiga al fondo del vial.

#### 1. Chromo-LAL, lisado de amebocitos de *Limulus* coliofilizado con sustrato cromógeno

Este reactivo es un extracto acuoso de amebocitos de *L. polyphemus*, amortiguado a pH 7 y coliofilizado con el sustrato cromógeno. Reconstituya el Chromo-LAL inmediatamente antes del uso con 3,2 mL de agua con reactivo de LAL (LAL Reagent Water, LRW). Esta solución es estable durante 24 horas a 2-8 °C, o durante dos semanas a -20 °C o inferior si se congeló inmediatamente después de la reconstitución y no está contaminada. Chromo-LAL puede congelarse y descongelarse una vez. La contaminación puede indicarla un color amarillo oscuro que se desarrolla rápidamente después de la reconstitución. El reactivo se volverá amarillo lentamente en condiciones de uso normales.

#### 2. Estándar de endotoxina

La endotoxina estándar de control (EEC) no se suministra con Chromo-LAL y debe pedirse por separado. La 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. También puede utilizarse estándar de referencia de endotoxina de la USP. Siga las instrucciones del fabricante para reconstituir y conservar las endotoxinas estándar. Los lotes de EEC pueden mostrar diferentes potencias (UE/ng) cuando se analizan con lotes distintos de Chromo-LAL. Si se utiliza una EEC, las concentraciones de endotoxina se pueden expresar en UE/mL si la potencia de un lote dado de EEC se ha determinado con el lote de Chromo-LAL en cuestión. (10, 11).

#### 3. Agua con reactivo LAL (Reagent Water, LRW)

El LRW es agua estéril preparada por destilación o por ósmosis inversa que no muestra endotoxina detectable cuando se analiza con Chromo-LAL. Pueden pedirse más viales de LRW a Associates of Cape Cod, Inc.

**Precauciones y advertencias:** Chromo-LAL es para uso en diagnóstico *in vitro* solamente. No utilice estos reactivos para la detección de endotoxemia. Tenga cuidado al manipular el reactivo Chromo-LAL, ya que su

toxicidad no se ha determinado y se han documentado alergias al LAL (7). Debe utilizarse una técnica aséptica. Todos los materiales que entren en contacto con muestras y reactivos deben estar libres de endotoxina detectable. Los materiales termoestables, incluido los materiales de vidrio limpios, pueden liberarse de endotoxina detectable exponiéndolos a calor seco a una temperatura mínima de 250 °C durante un mínimo de 30 minutos (8).

#### RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recoja las muestras de manera que se evite la contaminación microbiana. Utilice una técnica aséptica al manipular las muestras y los reactivos. Analice todas las muestras tan pronto como sea posible después de la recogida; si no, consérvelas a 2-8 °C. Si se prevé proliferación bacteriana, las muestras pueden congelarse. Confirme que la conservación no reduce el nivel de endotoxina detectable en la muestra (la endotoxina puede adsorberse a la superficie del recipiente). Hay muchas sustancias que interfieren con el análisis Chromo-LAL. La interferencia indica la inhibición, la recuperación de menos endotoxina de la que se sabe que está presente en una muestra, o por el realce, la recuperación de más endotoxina que la cantidad que se sabe que está presente (consulte «Procedimiento» para obtener información sobre la detección de la interferencia). La interferencia suele evitarse diluyendo la muestra con agua con reactivo LAL. No diluya a más de la dilución válida máxima (DVM; 9, 10, 11, 12).

límite de endotoxina x concentración  
de producto

$$DVM = \frac{\lambda}{\lambda}$$

Para eliminar la interferencia, ciertos compuestos pueden requerir un tratamiento especial además de la dilución. Por ejemplo, los hemoderivados que contienen enzimas activados pueden hacer que se obtengan resultados positivos falsos. Estos tipos de muestras pueden diluirse con agua con reactivo LAL y calentarse a una temperatura mínima de 75 °C durante un periodo de tiempo que se haya demostrado que elimina la interferencia sin que se pierda la actividad de la endotoxina. Las muestras que se absorban mucho a 405 nm pueden interferir con el análisis y pueden requerir la dilución previa.

#### PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

##### Equipos y materiales necesarios no suministrados:

1. Tubos de ensayo, microplacas, o equivalentes libres de endotoxina detectable. Associates of Cape Cod, Inc., puede suministrar tubos de ensayo y microplacas libres de endotoxina interferente.
2. Pipetas y puntas de pipeta que estén libres de endotoxina detectable. Pueden conseguirse a través de Associates of Cape Cod, Inc.
3. Pipetas de repetición con jeringas dispensadoras libres de endotoxina detectable.
4. Agitadora vorticial.
5. Parafilm M®. El lado en contacto con el papel protector es habitualmente apirógeno.
6. Lector óptico equipado con software adecuado y capaz de mantener una temperatura uniforme de 37±1 °C.
7. Software cinético. Software que recoge y guarda lecturas de densidad óptica (DO) a intervalos cortos,

si es necesario. El software también debe calcular el «tiempo de comienzo» de la muestra contenida en cada pocillo. El tiempo de comienzo es el tiempo que tarda la DO de un pocillo dado en alcanzar un valor de DO especificado (DO de comienzo). El valor elegido para un análisis realizado en una microplaca puede ser de entre 0,03 y 0,2 unidades de DO; no obstante, para los análisis de rutina debe utilizarse el mismo valor empleado para la validación del ensayo de ese producto.

El software deberá generar los parámetros de la curva estándar (pendiente, intersección y coeficiente de correlación) y calcular las concentraciones de endotoxina en las muestras desconocidas. El software puede realizar otros cálculos, como el de la concentración de la endotoxina recuperada en el control de producto positivo tras la sustracción de cualquier endotoxina endógena presente en la muestra.

#### Curva estándar

Al preparar una curva estándar, incluya una curva estándar consistente en al menos tres concentraciones de endotoxina, por duplicado, con cada grupo de muestras de análisis. Deberán añadirse más concentraciones, de forma que haya al menos un estándar por incremento logarítmico del rango (10). Prepare las concentraciones de endotoxina estándar por dilución en serie, empezando por la concentración más alta o «de partida». Mezcle la concentración de partida aproximadamente 30 segundos con una agitadora vorticial antes de llevar a cabo la primera transferencia.

Puede utilizarse cualquier programa de dilución para preparar endotoxinas estándar, y las concentraciones utilizadas para construir la curva pueden abarcar cualquier rango que esté dentro de los límites de 0,005 a 50 UE/mL. La concentración más baja retenida en la curva es la sensibilidad ( $\lambda$ ) del ensayo.

En la tabla siguiente se presenta un ejemplo de la preparación de una serie de rango amplio con  $\lambda$  igual a 0,005 UE/mL.

Concentraciones estándar en UE/mL	Agua con reactivo LAL ( $\mu$ L)	Solución estándar de endotoxina
50	950	50 $\mu$ L de la solución de partida
5	900	100 $\mu$ L de la solución de 50 UE/mL
0,5	900	100 $\mu$ L de la solución de 5 UE/mL
0,05	900	100 $\mu$ L de la solución de 0,5 UE/mL
0,005	900	100 $\mu$ L de la solución de 0,05 UE/mL
Contr. neg.	1000	

No se recomienda utilizar una curva estándar archivada (10). Los parámetros de la curva cambiarán con el tiempo

tras la reconstitución del reactivo. Por tanto, con cada análisis deberán incluirse concentraciones estándar de endotoxina.

#### Control negativo

Con cada grupo de muestras deberán incluirse controles negativos por duplicado. El control negativo es el LRW utilizada para diluir las muestras para el análisis. El tiempo de comienzo del control negativo deberá ser al menos un 10 % superior al del estándar menos concentrado. Una vez que se conozca la eficacia analítica del control negativo, el operador puede detener el ensayo antes de que finalice el tiempo de ejecución preajustado (consulte el apartado «Tiempo de realización del ensayo»). Detenga el ensayo solamente si puede concluirse, mediante la inspección visual de la cinética de la reacción, que la concentración más baja del estándar ha alcanzado la DO de comienzo y que la DO del control negativo es característicamente baja.

#### Detección de interferencia

A la muestra a la que se le añade una cantidad conocida de estándar de endotoxina (muestra enriquecida) se la denomina control de producto positivo; este control para la detección de la inhibición o el realce se incluye en un protocolo de análisis de rutina. La comparación de la recuperación de la concentración de endotoxina en el control de producto positivo con la concentración conocida que se ha añadido permite determinar si la muestra inhibe (se detecta menos endotoxina de la que hay presente) o realza (se detecta más endotoxina de la que hay presente) el ensayo.

La concentración media calculada de endotoxina añadida (concentración en la muestra enriquecida menos la concentración en la muestra) debe estar entre un 50 % y un 200 % de la concentración enriquecida esperada que muestre que el producto ni inhibe ni realza el ensayo.

La concentración elegida para el enriquecimiento dependerá del rango de la curva estándar y del límite de endotoxina para la dilución o concentración de la muestra que se esté analizando (umbral pasa/no pasa, 10).

La concentración enriquecida deberá ser una de las concentraciones utilizadas en la curva estándar y deberá estar cerca de la mitad del rango estándar. En el caso de la curva de rango amplio ilustrada más arriba y con muestras que tengan un umbral pasa/no pasa inferior o igual a 1 UE/mL, puede elegirse una concentración de endotoxina de 0,5. Para el mismo rango de estándares y con muestras que tengan un umbral pasa/no pasa superior a 1 UE/mL, puede elegirse hasta 5,0 UE/mL. Para rangos de concentraciones estándar más reducidos, por ejemplo de 0,005 a 1,6 UE/mL, una concentración de  $4\lambda$  o 0,02 UE/mL sería más adecuada, sobre todo si el umbral pasa/no pasa es muy inferior a 1 UE/mL.

#### Ensayo: Ejemplo para una microplaca de 96 pocillos

1. Lleve las muestras y los controles a la temperatura ambiente. Mezcle bien cada uno de ellos en una agitadora vortical inmediatamente antes de la transferencia al pocillo o los pocillos de la microplaca.
2. Transfiera 100  $\mu$ L de muestra o control a la microplaca.
3. Preincube la microplaca a  $37\pm 1$  °C durante un mínimo de 10 minutos.

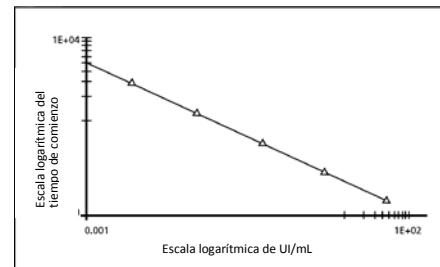
4. Reconstituya el reactivo Chromo-LAL con 3,2 mL de agua con reactivo LAL o con amortiguador Glucashield®.
5. Transfiera 100  $\mu$ L de reactivo Chromo-LAL reconstituido a cada pocillo lo más rápido posible utilizando una pipeta de repetición. La proporción de muestra y lisado deberá ser 1:1.
6. Cubra la microplaca con Parafilm y mezcle bien, evitando que la mezcla de reacción salpique; esta es una opción que ofrecen algunos lectores.
7. Retire el Parafilm con el que cubrió la microplaca y colóquela inmediatamente en la incubadora/el lector de microplacas que se haya ajustado para leer a 405 nm. Incube a  $37\pm 1$  °C e inicie el software cinético.

#### Tiempo de realización del ensayo

El tiempo necesario para que finalice la reacción depende del rango de concentraciones de endotoxina elegido para la curva estándar y de las características específicas del lote. El «tiempo de ejecución», utilizando una DO de comienzo de 0,05, suele ajustarse a 60 minutos en el caso de que la sensibilidad del ensayo sea de 0,05 UE/mL o a 100 minutos si la sensibilidad es de 0,005 UE/mL.

#### RESULTADOS

La concentración de endotoxina del tiempo de comienzo correspondiente de la muestra desconocida se lee a partir de la curva estándar, que es un gráfico log-log de los tiempos de comienzo frente a las concentraciones estándar, o un gráfico aritmético de los logaritmos de los tiempos de comienzo frente a los logaritmos de las concentraciones estándar. A continuación se muestra una curva estándar típica.



La ecuación de la línea log-log generada para la curva estándar ilustrada es  $Y = -0,2X + 3,14$ , donde Y = logaritmo del tiempo de comienzo y X = logaritmo de la concentración de endotoxina. La concentración de endotoxina en una muestra desconocida con un tiempo de comienzo medio de 1630 segundos se calcularía convirtiendo el tiempo de comienzo a su valor logarítmico, 3,212, resolviendo la ecuación para X y tomando el antilogaritmo de X para obtener la concentración:

$$\begin{aligned} X &= (Y - 3,14) / -0,2 \\ X &= (3,212 - 3,14) / -0,2 \\ X &= -0,36 \\ \text{Antilog}(-0,36) &= 0,44 \text{ UE/mL} \end{aligned}$$

#### LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento está limitado por la magnitud de la inhibición o del realce demostrados por la muestra de análisis. Si la interferencia no puede eliminarse mediante dilución u otros medios a la DVM, el ensayo Chromo-LAL no puede utilizarse para medir la endotoxina en esa muestra.

#### VALORES PREVISTOS

La endotoxina presente en la muestra de análisis puede cuantificarse entre el rango de concentraciones de endotoxina utilizadas para construir la curva estándar. Para notificar resultados en unidades de endotoxina (UE) o unidades internacionales (UI) de endotoxina, es necesario utilizar o la endotoxina de referencia estándar (USP, segundo estándar internacional) o un estándar de control con la potencia calibrada respecto a la referencia.

Si es necesario diluir la muestra de análisis para superar la inhibición o el realce, la cantidad mínima de endotoxina que pueda detectarse se incrementará en consecuencia.

#### EFICACIA ANALÍTICA

La linealidad de la curva estándar, dentro del rango de concentración utilizado para determinar los niveles de endotoxina, debe verificarse realizando el análisis en el número adecuado de concentraciones estándar (vea la curva mostrada más arriba) por triplicado (10). Calcule los parámetros de la curva estándar sin promediar los tiempos de comienzo de las réplicas. El valor absoluto del coeficiente de correlación, r, debe ser superior o igual a 0,980. El mismo criterio de linealidad se aplica a las curvas estándar que se incluyen con las pruebas de rutina (vea la curva estándar mostrada más arriba).

Nota: Si el coeficiente de correlación característico de la eficacia del análisis de regresión lineal cumple los criterios aceptables de ser superior o igual a 0,980, puede usarse un análisis de regresión polinomial para generar los resultados de control y de la muestra.

#### REFERENCIAS

1. Bang, F.B. The toxic effect of a marine bacterium on Limulus and the formation of blood clots. Biol. Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362 (1953).
2. Levin, J., and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345 (1964).
3. Levin, J., and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274 (1964).
4. 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.
5. Nakamura, S., T. Morita, S. Iwanaga, M. Niwa, and K. Takahashi. 1977. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes. J. Biochem. 81:1567-1569.
6. Iwanaga, Morita, Harada, Nakamura, Niwa, Takada, Kimura, and Sakakibara. 1978. Chromogenic Substrates for Horseshoe Crab Clotting Enzymes Its application for the assay of Bacterial Endotoxins. Haemostasis 7: 183-188.
7. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. Type I allergy induced by Limulus Amebocyte

Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419 (1992).

8. Tsuji, K. and S.J. Harrison. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714 (1978).
9. USP, Bacterial endotoxins test. Current edition.
10. Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration. July 15 (1991).
11. FDA 2012 Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers
12. European Pharmacopoeia, third edition publ. Section 2.6.14. Bacterial Endotoxins. European Pharmacopoeia Secretariat, Strasbourg, June (1996).