

<h1>Lisado de amebocitos de <i>Limulus</i></h1>	
<h2>PYROCHROME®</h2>	
Fabricado por:	
	ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED <small>124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA</small>
Teléfono:	+1 (508) 540-3444
Fax:	+1 (508) 540-8680
Asistencia Técnica:	+1 (800) 848-3248
Servicio de Atención al Cliente:	+1 (800) 525-8378
PN000856-es Rev1	Licencia estadounidense n.º 700
	Enero de 2011

PYROCHROME®

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

La prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), utilizada de acuerdo con las pautas de la Food and Drug Administration (FDA) estadounidense (1), puede sustituir a la prueba de pirógenos (prueba de la tularemia) de la U.S. Pharmacopeia (USP) para el control del producto terminado de «fármacos inyectables para humanos (incluidos los productos biológicos), fármacos inyectables para animales y productos sanitarios». La prueba del LAL está recomendada para la cuantificación de endotoxinas en materias primas utilizadas en procesos de producción, incluida el agua, y para la vigilancia de las concentraciones de endotoxinas durante dichos procesos. La Bacterial Endotoxins Test de la USP (2) es la prueba del LAL oficial a la que se hace referencia en monografías específicas de la USP, y está homologada con los capítulos equivalentes de la Farmacopea Europea (EP) (3) y la Farmacopea Japonesa (JP) (4).

Resumen de la prueba

El lisado de amebocitos de *Limulus* es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). En presencia de endotoxinas, ciertos factores presentes en el LAL se activan en una cascada proteolítica que produce la escisión de un sustrato peptídico artificial incoloro presente en el LAL Pyrochrome®. La escisión proteolítica del sustrato libera para-nitroanilina (pNA), que es amarilla y absorbe a 405 nm. La prueba se realiza añadiendo un volumen de Pyrochrome® a un volumen de muestra e incubando la mezcla de reacción a 37 °C. Cuanto mayor sea la concentración de endotoxinas de la muestra, más rápido se producirá la pNA. Hay dos formas de utilizar el Pyrochrome® para cuantificar la concentración de endotoxinas (5). En el método cinético se determina el tiempo que se tarda en alcanzar una absorbancia específica a 405 nm (el tiempo de activación). Cuanto mayor sea la concentración de endotoxinas, menor será el tiempo de activación. El análisis requiere instrumental especializado para incubar varias muestras a temperatura controlada (normalmente 37 °C) y para obtener lecturas de la densidad óptica a intervalos regulares. A continuación puede representarse gráficamente el logaritmo del tiempo de activación en función del logaritmo de la concentración de endotoxina estándar para obtener curvas estándares con las que se pueden calcular las concentraciones de endotoxinas de las muestras. Por otra parte, el método cromogénico de criterio de valoración consiste en medir la cantidad de pNA liberada después de un periodo de incubación fijo. Las concentraciones de endotoxinas de las muestras se determinan a partir de una curva estándar, que es una representación gráfica de las medidas de la densidad óptica en función de la concentración conocida de endotoxina estándar. En los casos de muestras que absorban a 405-410 nm puede emplearse una modificación de diazoacoplamiento. En este método, la pNA (formada durante el método cromogénico de criterio de valoración) se hace reaccionar con nitrilo en HCl y, a continuación, con N-(1-nafilil)-etilenediamina (NEDA) para obtener un derivado diazoado magenta que absorbe a un intervalo de 540-550 nm.

Los métodos de análisis Pyrochrome® son rápidos, específicos, fáciles de utilizar y muy sensibles. El límite de detección depende del método y el instrumental empleados, y puede llegar a tener una sensibilidad de 0,001 unidades de endotoxinas (UE) por mL.

Historia y principio biológico

Howell describió la coagulación de la sangre de *Limulus* en 1885 (6). En los años cincuenta del siglo XX, en el Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts (EE.UU.), Bang descubrió que las bacterias gramnegativas provocan la coagulación de la sangre de *Limulus* (7). Posteriormente, Levin y Bang determinaron que la reacción es enzimática y que las enzimas se encuentran en gránulos de los amebocitos (8, 9). Dichos autores demostraron que la coagulación la inicia un componente estructural exclusivo de la pared celular bacteriana, denominado endotoxina o lipopolisacárido (10). Actualmente se sabe que la reacción consiste en una cascada de pasos de activación enzimática que terminan con la escisión de la proteína, que es coagulogéna. El producto insoluble de la escisión del coagulógeno (coagulina) se une por interacción iónica. Si se forma suficiente coagulina, aparece turbidez, seguida de la formación de un coágulo de gel. Esta interacción es la base de un análisis de endotoxinas denomi-nado prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL). En 1977, investigadores japoneses descubrieron

que el LAL activado por endotoxinas también escindía pequeños péptidos cromogénicos que contenían un lugar de escisión de aminoácidos similar al del coagulógeno y el cromóforo paraitroanilida (11). La escisión provoca la liberación de pNA, que es amarilla y absorbe luz a 405 nm. En esta adaptación cromogénica del análisis de LAL, la concentración de coagulógeno se reduce mediante dilución para minimizar las interferencias producidas al añadir sustrato cromogénico al LAL. Así, al añadir endotoxinas al reactivo de LAL cromogénico se forma un color, en vez de turbidez o un coágulo de gel. En todas las versiones del análisis de LAL (de coágulo de gel, turbidimétrico y cromogénico), cuanto mayor es la cantidad de endotoxinas presente, más rápido se desarrolla el criterio de valoración (coágulo de gel, turbidez o color). En la literatura científica actual puede obtenerse más información sobre los tipos de análisis de LAL, así como sobre su reacción y sus aplicaciones (12, 13, 14).

Reactivo

El Pyrochrome® se suministra en forma liofilizada, envasado en frascos de 3,2 mL. Contiene un extracto acuoso de amebocitos de *Limulus polyphemus*, estabilizante, sales, tampón y sustrato cromogénico.

El Pyrochrome® no tiene una sensibilidad específica asignada. La sensibilidad en un análisis dado (denominada λ) es la concentración de endotoxinas más baja utilizada para elaborar la curva estándar. La sensibilidad máxima, λ, del Pyrochrome® es de 0,001 UE/mL en análisis cinéticos y de 0,005 UE/mL en análisis de criterio de valoración. El Pyrochrome® está indicado solamente para procedimientos de diagnóstico *in vitro*, y no para el diagnóstico de endotoxemia en humanos. La toxicidad del Pyrochrome® no se ha determinado. Sin embargo, el contacto prolongado o reiterado del LAL con la piel ha producido reacciones alérgicas de tipo I en algunas personas (15), por lo que debe tenerse cuidado al manipular el Pyrochrome®.

Procedimiento de reconstitución:

- Dé unos golpecitos en el frasco de Pyrochrome® para hacer que el material suelto caiga al fondo. Levante el tapón gris para deshacer el vacío. No contamine la boca del frasco. Retire y deseché el tapón; no inyecte a través de él ni lo reutilice. Una pequeña cantidad de polvo de LAL remanente en el tapón no afectará a la prueba.
- Reconstituya el Pyrochrome® con 3,2 mL de tampón de Pyrochrome® o Glucashield® (que puede adquirirse por separado a Associates of Cape Cod, Inc.). Para obtener una sensibilidad de 0,001 UE/mL en un lector de microplacas, es necesario reconstituir el Pyrochrome® con Glucashield®. Esta sensibilidad puede lograrse bien con el tampón de reconstitución de Pyrochrome® o con tampón Glucashield® en un lector de tubos. La pella tardará algunos minutos en disolverse en la solución, por lo que deberá rehidratar el producto al menos 5 minutos antes de su uso. Agite el frasco para asegurar la homogeneidad, pero evite hacerlo con demasiada brusquedad, ya que podría producir exceso de espuma y pérdida de sensibilidad. Cubra el frasco con Parafilm M® y consérvelo frío (entre 2 y 8 °C) cuando no lo esté utilizando. El Pyrochrome® debe utilizarse en las 8 horas posteriores a su reconstitución.

Condiciones de almacenamiento

El Pyrochrome® liofilizado es relativamente estable y, si se almacena adecuadamente, mantendrá toda su actividad hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Almacene el producto entre 2 y 8 °C. Las temperaturas de más de 37 °C pueden producir un rápido deterioro del Pyrochrome® liofilizado, que se manifiesta por la pérdida de sensibilidad y por un marcado amarilleo del producto. El Pyrochrome® se suministra en recipientes aislados para protegerlo de las temperaturas altas. Antes de su reconstitución, el Pyrochrome® es sensible a la luz y debe almacenarse en un lugar oscuro.

Por lo general, el Pyrochrome® reconstituido es transparente y ligeramente opalescente. Es posible que algún lote muestre una ligera turbidez uniforme. La presencia de pequeñas fibras o hebras no indica contaminación ni afecta a la actividad; no obstante, la precipitación floculante o un marcado color amarillo indican deterioro, por lo que el reactivo no deberá utilizarse. El Pyrochrome® reconstituido es menos estable que el producto liofilizado; los frascos pueden mantenerse hasta 8 horas entre 2 y 8 °C. Tenga en cuenta que puede ser necesario utilizar reactivo recién reconstituido para obtener la sensibilidad máxima. El Pyrochrome® reconstituido no puede congelarse.

Recogida y preparación de las muestras

Las muestras deben recogerse asepticamente en recipientes que no contengan endotoxinas detectables. Para minimizar la adsorción de endotoxinas a las superficies de los recipientes, se recomienda utilizar recipientes de vidrio despirogenados reutilizables o recipientes de poliestireno o tereftalato de polietileno (PET) desechables estériles. No todos los recipientes de plástico están libres de endotoxinas detectables. Además, las sustancias extraíbles de algunos plásticos pueden interferir en la prueba. La aceptabilidad del material de laboratorio debe comprobarse seleccionando al azar algunos recipientes de un lote, enjuagándolos con una pequeña cantidad de agua de reactivo de LAL (ARL) a temperatura ambiente durante una hora y analizando el producto del enjuague como si fuera una muestra. El producto del enjuague debe contener una concentración de endotoxinas muy inferior a la concentración del estándar más bajo que se vaya a utilizar. Además, el producto del enjuague no debe inhibir ni potenciar la prueba, lo que puede comprobarse determinando la recuperación obtenida de una cantidad conocida de endotoxinas añadida. El pH de la mezcla de reacción (un volumen de muestra o de dilución de muestra mezclado con el mismo volumen de Pyrochrome®) debe estar entre 6 y 8. Ajuste el pH de la muestra con HCl, NaOH o tampón (sin endotoxinas detectables). Diluya el HCl o el NaOH concentrados con ARL hasta obtener una concentración adecuada y utilice un volumen que no

produzca una dilución excesiva de la muestra que se vaya a analizar. Si al ajustar el pH se forma un precipitado en la muestra, diluya ésta (sin sobrepasar la DMV, consulte el apartado «Limitaciones del procedimiento») antes de ajustar el pH. No ajuste el pH del agua ni de las soluciones salinas no tamponadas. Tenga en cuenta que la dilución por sí sola puede solucionar los problemas de pH.

Las sustancias que desnaturalizan las proteínas, que quelan iones, que se unen a las endotoxinas o que alteran el estado hidrófobo de las endotoxinas pueden interferir en la prueba. La recuperación de una cantidad de endotoxinas considerablemente superior o inferior a la esperada tras añadir una cantidad conocida de endotoxina estándar a la muestra (consulte «Limitaciones del procedimiento») indica la presencia de interferencias. En la mayoría de los casos, la dilución de la muestra reducirá la concentración y la actividad de las sustancias interferentes sin invalidar los resultados de la prueba. Para obtener información sobre los controles y los niveles de dilución adecuados, consulte «Procedimiento analítico». Las muestras deben analizarse tan pronto como sea posible después de su recogida. Puede ser conveniente congelar las muestras no estériles que se vayan a conservar o a enviar antes de analizarlas. Las muestras que se espere que tengan concentraciones bajas de endotoxinas deben analizarse para comprobar si ha habido pérdida de endotoxinas durante el periodo de almacenamiento.

Procedimiento analítico

Reactivos analíticos suministrados con el Pyrochrome®

- Pyrochrome®* (descrito en los apartados «Reactivo» y «Procedimiento de reconstitución» anteriores).
- Tampón de reconstitución de Pyrochrome®* (número de catálogo C1500 solamente). Utilice el tampón para reconstituir el Pyrochrome® de la forma descrita más arriba.
- Tampón de reconstitución Glucashield®* (número de catálogo CG1500 solamente). Utilice el tampón para reconstituir el Pyrochrome® de la forma descrita más arriba.
- Endotoxina estándar de control* (EEC), sólo en el kit Diazo (CD060): Cada frasco de EEC contiene 10 ng. Reconstituya la EEC con el volumen especificado en el certificado de análisis (C de A, en el que se indica la potencia de la EEC). La fórmula de la EEC se ha diseñado especialmente para que se disuelva con rapidez. Tras añadir ARL, agite en vórtex el frasco de 30 a 60 segundos. La EEC estará entonces lista para utilizarse. Si no se utiliza inmediatamente, agite en vórtex el frasco durante 30 segundos. A continuación, prepare las diluciones adecuadas para obtener las concntraciones de endotoxinas deseadas. Agite en vórtex los frascos entre una dilución y otra. La EEC reconstituida es estable durante siete días si se almacena entre 2 y 8 °C. No congele la EEC reconstituida.

Cada frasco de EEC contiene endotoxinas con una actividad, especificada en el C de A, determinada con respecto a la endotoxina estándar de referencia (EER) estadounidense. El Endotoxin Reference Standard de la USP (idéntico a la EER) puede adquirirse a la U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.

Nota: El C de A y la potencia especificada en él son específicos de la combinación de un lote de Pyrochrome® y uno de EEC. Un lote determinado de EEC puede mostrar diferentes potencias (UE/ng) si se analiza con diferentes lotes de Pyrochrome® o con Pyrotell o Pyrotell-T. De la misma forma, es probable que diferentes lotes de EEC muestren diferentes potencias al analizarlos con un mismo lote de Pyrochrome®. **Asegúrese de utilizar el C de A y la potencia correctos.**

Utilice la EEC para preparar concentraciones de endotoxina estándar a fin de elaborar curvas estándares a partir de ellas, para los controles positivos y para los controles de productos positivos (denominados también controles de interferencias). No utilice esta EEC (10 ng/frasco) como control de despirogenación.

- Diazoreactivos*, sólo en el kit Diazo (CD060): Frasco 1a, HCl; frasco 1, nitrilo de sodio; frasco 2, sulfamato de amonio; frasco 3, NEDA. Reconstituya el frasco 1 con todo el contenido del frasco 1a, reconstituya el frasco 2 con 4 mL de agua y reconstituya el frasco 3 con 4 mL de agua. Para obtener el tipo de agua necesario, consulte el punto 5 siguiente.

Reactivos analíticos no suministrados con el Pyrochrome®

- Endotoxina estándar de control* (EEC). (Associates of Cape Cod, Inc., número de catálogo EC010). Reconstituya la EEC con el volumen especificado en el certificado de análisis (C de A, en el que se indica la potencia de la EEC) y de la forma descrita en el prospecto del envase. Siga las instrucciones del prospecto para utilizar y almacenar la endotoxina estándar. La potencia de la EEC se ha determinado con respecto a la endotoxina estándar de referencia (EER) estadounidense y se especifica en el C de A. El Endotoxin Reference Standard de la USP (idéntico a la EER) puede adquirirse a la U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. **Nota:** El C de A y la potencia especificada en él son específicos de la combinación de un lote de Pyrochrome® y uno de EEC. Un lote determinado de EEC puede mostrar diferentes potencias (UE/ng) si se analiza con diferentes lotes de Pyrochrome®, Pyrotell u otras marcas de reactivo de LAL (1). De la misma forma, es probable que diferentes lotes de EEC muestren diferentes potencias al analizarlos con un mismo lote de Pyrochrome®. **Asegúrese de utilizar el C de A y la potencia correctos.**

Utilice la EEC para preparar diluciones de endotoxina estándar a fin de elaborar curvas estándares a partir de ellas, para los controles positivos y para los controles de productos positivos (denominados también controles de interferencias).

- Agua de reactivo de LAL* (ARL). Las fuentes recomendadas para adquirirla incluyen Associates of Cape Cod, Inc. (hay varios tamaños y configuraciones de envase disponibles). Puede utilizarse agua USP para inyectables estéril (API estéril) comercial sin bacteriostáticos o agua USP para irrigación, siempre y cuando se haya comprobado que sean aceptables como ARL. El límite de endotoxinas del API USP estéril es de sólo 0,25 UE/mL, por lo que el API estéril puede contener endotoxinas detectables y ser inadecuada para utilizarse en esta prueba.

Para certificar que un agua es aceptable como ARL, analicela como si fuera una muestra con un control de producto positivo (consulte el punto 1.c. del apartado «Controles»). Utilice ARL certificada para diluir los estándares y para preparar los controles positivos (consulte los puntos 1.a y 1.b. de «Controles»). Elabore una curva estándar a partir de los tiempos de activación o de los análisis del criterio de valoración de los estándares. El coeficiente de correlación debe ser de al menos 0,980 (valor absoluto). La concentración de endotoxinas del agua que se esté analizando puede calcularse mediante extrapolación de la curva estándar por debajo de la concentración de endotoxinas más baja, y debe ser significativamente inferior a la del estándar más bajo. Además, la concentración de endotoxinas del control de producto positivo debe estar dentro del intervalo del ±25% de la concentración de un control positivo.

- Tampón Glucashield®*. Puede adquirirse a Associates of Cape Cod, Inc., (número de catálogo GB051) y utilizarse en lugar del tampón de reconstitución de Pyrochrome® para evitar las interferencias de los (1→3)-β-D-glucanos.

- Ácido acético al 50%* (para el método de criterio de valoración). Prepárelo añadiendo un volumen de ácido acético glacial al mismo volumen de agua destilada o de agua tratada por ósmosis inversa (puede utilizarse ARL, consulte el punto 2. anterior, pero no es necesario).

- Agua* (solamente para la reconstitución de los reactivos diazoacopladores). Es aceptable cualquier fuente de laboratorio de agua destilada (incluida la ARL), desionizada o tratada por ósmosis inversa. Esta agua no necesita estar libre de endotoxinas, ya que sólo se utiliza para la química diazoacopladora.

Materiales y equipo

- Microplacas*. Microplacas de 96 pocillos cubiertas (pueden adquirirse a Associates of Cape Cod, Inc., número de catálogo CA961). Las placas deben estar certificadas o analizarse para asegurar la ausencia de contaminación por endotoxinas o glucanos, y no deben producir inhibición ni potenciación. Compruebe las microplacas antes de utilizarlas y deséchelas si se observan arañazos o interferencias ópticas en la base o en el fondo de los pocillos.

- Tubos de reacción*. Los análisis cinéticos pueden realizarse en un lector de tubos con función de incubación, como el Pyros Kinetix® Flex, utilizando tubos de cultivo de vidrio de borosilicato despirogenados de 8 x 75 mm (Associates of Cape Cod, Inc., número de catálogo TK100). Los análisis de criterio de valoración también pueden realizarse en tubos de cultivo de vidrio de borosilicato despirogenados de 8 x 75 mm o 10 x 75 mm (Associates of Cape Cod, Inc., números de catálogo TK100 y TB050, respectivamente).

- Lector óptico* capaz de leer a 405 nm, o a 540-550 nm para el método de diazoacoplamiento. Para el método cinético, utilice un lector de microplacas con función de incubación, como el BioTek® ELx808™ o el Molecular Devices VersaMax™, o un lector de tubos como el Pyros Kinetix® Flex (Associates of Cape Cod, Inc., números de catálogo PKF32, PKF64 y PKF96).

Para el método de criterio de valoración, utilice un lector de microplacas para leer las microplacas o bien, si realiza la prueba en tubos, un espectrofotómetro con las cubetas adecuadas.

- Incubadora* capaz de mantener una temperatura de 37±1 °C (necesaria solamente para los métodos de criterio de valoración). Se recomienda utilizar una incubadora de bloque seco para las microplacas (o los tubos, según corresponda). (Para el método de criterio de valoración en tubos de ensayo puede utilizarse un baño de agua). Debe comprobarse que las incubadoras distribuyan uniformemente el calor.
- Gradillas* para sostener y/o incubar los tubos de dilución y de reacción.
- Pipetas*, micropipetas con puntas de pipeta (las pipetas multicanal son útiles cuando se emplean microplacas) o pipetas de repetición con cilindros de jeringa de plástico. Se recomienda utilizar pipetas y puntas de pipeta desechables y libres de endotoxinas y glucanos interferentes. Associates of Cape Cod, Inc., ofrece la línea de productos Pyroclear®, con certificado de ausencia de endotoxinas y glucanos interferentes.
- Mezclador tipo vórtex*.

- Parafilm M®* (American National Can™). Por lo general, el lado que está en contacto con el papel protector está libre de endotoxinas detectables.

Tubos de ensayo libres de endotoxinas interferentes, con la capacidad adecuada para hacer diluciones de los estándares de endotoxinas o de las muestras que se desee analizar. Los recipientes adecuados para hacer las diluciones se especifican en «Recogida y preparación de las muestras».

- Horno de aire caliente* con capacidad para calentar hasta 250 °C como mínimo para la despirogenación del material de vidrio. Los ciclos de despirogenación utilizados

comúnmente aseguran que todos los artículos que haya dentro del horno se expongan un mínimo de 30 minutos a una temperatura mínima de 250 °C (2, 16, 17).

Controles

Los controles son necesarios para garantizar la validez de las pruebas. Los procedimientos recomendados han sido detallados por la FDA (1), la USP (2), la EP (3) y la JP (4).

1. Controles de endotoxinas.

- a. **Serie de estándares de endotoxinas.** Prepare un nuevo conjunto de diluciones para cada prueba a partir de la solución madre de endotoxinas. No utilice diluciones preparadas previamente y almacenadas, a menos que haya comprobado la estabilidad de ese intervalo de concentraciones. Haga una serie geométrica de diluciones para obtener el intervalo de concentraciones de endotoxinas requerido. Para los métodos de criterio de valoración se recomienda utilizar diluciones dobles; para el método cinético pueden emplearse diluciones mayores. La concentración de endotoxinas más baja de cualquier serie de estándares es el límite de detección de esa prueba particular, y se denomina *λ*. (**Nota:** Pyrochrome® permite alcanzar límites de detección de 0,005 y 0,001 UE/mL en pruebas de criterio de valoración y cinéticas, respectivamente). Para obtener el intervalo de estándares requerido, utilice el menor número de diluciones posible con volúmenes de pipeta adecuados para maximizar la exactitud. Las diluciones pueden hacerse en tubos de ensayo de vidrio o de plástico adecuado, o directamente en una microplaca. Las concentraciones máximas detectadas con el Pyrochrome® dependen del método. Como guía, consulte los tiempos de incubación recomendados disponibles para el Pyrochrome®.
- b. **Control positivo** (una sola concentración de endotoxina estándar), que debe incluirse si la serie de estándares (consulte el punto a. anterior) no se prepara de la misma forma que los controles de productos positivos (consulte el punto c. siguiente). La concentración de endotoxinas del control positivo debe ser igual a la de un estándar del centro de la curva estándar. Para los controles positivos incluidos con una serie de estándares compuesta de concentraciones de 0,005, 0,05, 0,5, 5 y 50 UE/mL sería adecuado un valor de 0,5 UE/mL. Cuando no se incluya una serie de estándares en una prueba, deberá incluirse un control positivo para comprobar si es adecuado utilizar los parámetros de una curva estándar anterior (archivada) para calcular las concentraciones de endotoxinas. Para obtener más información, consulte el apartado sobre análisis rutinarios de fármacos mediante la prueba del LAL (Routine Testing of Drugs by the LAL Test) de las pautas de la FDA (1). El control positivo debe prepararse en agua de la misma manera que el control positivo del producto (PPC).
- c. Los controles de productos positivos son controles de inhibición/potenciación y consisten en la muestra o la dilución de la muestra a las que se añade endotoxina estándar. La concentración de endotoxinas añadidas de la muestra que se va a analizar debe ser la misma que la del control positivo. Consulte el punto b. anterior para seleccionar la concentración de endotoxinas adecuada para el control de producto positivo. La adición de endotoxinas suele denominarse «enriquecimiento».

2. Controles negativos.

Cada vez que se realice la prueba deben incluirse controles negativos de ARL.

Preparación de las muestras: determinación de la dilución de la prueba

Si se ha desarrollado previamente un protocolo analítico para el tipo de muestra que se desee analizar, prepare la dilución necesaria para el análisis y proceda de la forma indicada en «Realización de la prueba». Si no se ha desarrollado un protocolo para el tipo de muestra, haga una serie de diluciones décuplas de la muestra. No utilice diluciones de más del décuplo de la dilución máxima válida del producto. Consulte el apartado «Limitaciones del procedimiento», incluido más abajo, o las pautas de la FDA (1) para obtener información sobre la dilución máxima válida (DMV) y la concentración mínima válida (CMV), y sobre la forma de calcularlas. Prepare diluciones adecuadas de todas las muestras con un control de producto positivo para cada una.

Realización de la prueba

Para obtener resultados satisfactorios es necesario emplear una técnica uniforme. Todos los controles y las muestras deben analizarse por duplicado como mínimo. Al preparar la prueba debe tenerse cuidado para evitar la contaminación. El equipo debe estar calibrado y cualificado adecuadamente para asegurar que las temperaturas de incubación sean uniformes.

- Prepare el instrumental de la prueba como sea necesario. En un sistema automatizado, esto suele incluir la introducción de los descriptores de la muestra, el ajuste de los parámetros de la prueba y el encendido de la incubadora ajustada a 37 °C.
- Añada al recipiente de reacción el volumen adecuado de muestra (control negativo, estándar de endotoxinas, muestra o control de producto positivo) para obtener una proporción adecuada al añadir el Pyrochrome® (consulte el punto 3, incluido más abajo).

Pruebas realizadas en un lector de microplacas: se utiliza una proporción 1:1 de lisado y muestra. Para conseguir una eficacia óptima, utilice un volumen de 0,05 mL de muestra para dichos métodos (cinético, de criterio de valoración o de diazoacoplamiento). Para los métodos cinéticos y de criterio de valoración también

puede utilizarse 0,1 mL, aunque se recomienda utilizar 0,05 mL para conseguir la sensibilidad máxima o para obtener una curva estándar de un intervalo amplio (intervalo de más de tres logaritmos).

Pruebas realizadas en el lector de tubos Pyros Kinetix® Flex: puede utilizarse una proporción 1:1 o 1:4 de lisado y muestra. Las pruebas realizadas con una proporción 1:1 de reactivo de LAL Pyrochrome® y muestra requieren un volumen de muestra de 0,1 mL. En las pruebas realizadas en el lector de tubos Pyros Kinetix® Flex en las que se utilice una proporción 1:4 de reactivo de LAL Pyrochrome® y muestra, el volumen de muestra deberá ser de 0,2 mL.

- Añada la cantidad de Pyrochrome® adecuada para el método y mezcle. La mezcla incorrecta es una causa frecuente de análisis insatisfactorios. La mayoría de los lectores de placas tienen una función de agitación.

- Para las microplacas se utiliza una proporción 1:1 de lisado y muestra, y el volumen de Pyrochrome® añadido es igual al volumen de muestra (consulte el punto 2 anterior; por lo general 0,05 mL). Añada Pyrochrome® lo más rápidamente posible a todas las muestras y mezcle de 5 a 30 segundos. Ponga la placa sobre un bloque de incubadora (para las pruebas de criterio de valoración) o en el interior de un lector de microplacas con función de incubación (para las pruebas cinéticas).

- Para los métodos que emplean tubos o cubetas de reacción individuales, el volumen de Pyrochrome® añadido puede ser bien igual al volumen de muestra (0,1 mL en un lector de tubos Pyros Kinetix® Flex) o bien un cuarto del volumen de muestra (0,05 mL en un lector de tubos Pyros Kinetix® Flex). Importante: el tiempo de reacción debe ser el mismo para todos los tubos. En el caso del lector de tubos Pyros Kinetix®, el instrumento detecta el tubo de reacción al introducirlo y empieza a cronometrar. Haga lo siguiente en cada recipiente de reacción: añada Pyrochrome®, mezcle durante unos 2 segundos y coloque el recipiente en el dispositivo de incubación (al realizar pruebas de criterio de valoración) o en el lector de tubos (al realizar pruebas cinéticas).

Independientemente de que se utilicen microplacas o tubos de reacción, es conveniente utilizar una pipeta de repetición para añadir el Pyrochrome®.

Debe tenerse cuidado para evitar contaminar el frasco de Pyrochrome® al manipular el reactivo.

- Obtenga una lectura de la prueba.

- Si emplea el método cinético, deje que la prueba continúe hasta que todas las muestras se hayan incubado mucho más tiempo del requerido para que la concentración de endotoxina estándar más baja alcance la DO405 de activación. Los sistemas automatizados de análisis suelen dar por terminada la prueba después de un periodo de tiempo preestablecido. Solicite los tiempos de incubación recomendados como guía.

- Si emplea el método de criterio de valoración, cronometre la incubación de manera precisa, retire la placa o los tubos de reacción de la incubadora, detenga la reacción añadiendo ácido acético al 50% (un volumen suficiente para obtener una concentración final de ácido acético del 10%; utilice 0,025 mL para volúmenes de muestra/Pyrochrome® de 0,05 mL) y obtenga una lectura de la densidad óptica (DO) a 405 nm en un espectrofotómetro o un lector de microplacas (según corresponda). La configuración de la prueba y la lectura de resultados deben hacerse de forma que el tiempo de incubación de cada muestra sea el mismo (±30 segundos). El periodo de incubación depende del intervalo de concentraciones de endotoxinas deseado, y es probable que varíe con diferentes lotes de Pyrochrome®. Puede ser necesario realizar pruebas preliminares para determinar el periodo de incubación correcto. Consulte los tiempos de incubación recomendados como guía.

- Si emplea el método de criterio de valoración con diazoacoplamiento, extraiga los tubos de reacción o la placa de la incubadora y detenga la reacción añadiendo 0,05 mL de la solución 1 (nitrito de sodio reconstituido con HCl). Agite la placa para mezclar. Empleando una punta de pipeta nueva, añada 0,05 mL de la solución 2 (sulfamato de amonio) a cada pocillo de reacción y mezcle. Finalmente, añada 0,05 mL de la solución 3 (NEDA) a cada pocillo con una punta de pipeta nueva y mezcle. Debe generarse inmediatamente un color pleno (magenta). Obtenga la lectura de la prueba a 540-550 nm. La configuración de la prueba y la lectura de resultados deben hacerse de forma que el tiempo de incubación de cada muestra sea el mismo (±30 segundos). El periodo de incubación depende del intervalo de concentraciones de endotoxinas deseado, y es probable que varíe con diferentes lotes de Pyrochrome®.

Puede ser necesario realizar pruebas preliminares para determinar el periodo de incubación correcto.

Resultados

1. Cálculos preliminares.

- Si emplea el método cinético, determine el tiempo que tardan las muestras en alcanzar un umbral de densidad óptica determinado (normalmente 0,03 unidades de DO) después de haber realizado las correcciones necesarias de los datos. Las lecturas de densidad óptica deben obtenerse con relación a una

lectura inicial que se considera como de cero unidades de DO. Muchos lectores de microplacas tienen paquetes de software que realizan estos cálculos. El tiempo que se tarda en alcanzar el valor de DO se denomina tiempo de activación.

2. Elabore una curva estándar.

- Si emplea el método cinético, elabore una curva estándar mediante la regresión del logaritmo del tiempo de activación en función del logaritmo de la concentración de endotoxinas de los estándares. La ecuación de la línea de regresión describe la curva estándar.

Si el valor absoluto del coeficiente de correlación de la curva estándar es de 0,980 como mínimo (consulte el punto 2 del apartado «Interpretación», incluido más abajo), puede utilizarse una ecuación polinómica de segundo grado (esto es, cuadrática) de línea de regresión para calcular las concentraciones de endotoxinas.

- Si emplea el método de criterio de valoración, elabore una curva estándar representando gráficamente las lecturas de la densidad óptica en función de las concentraciones de endotoxina estándar.

3. Calcule las concentraciones de endotoxinas.

Calcule las concentraciones de endotoxinas de todas las muestras (incluidos los estándares y los controles) empleando la ecuación de una recta Y = aX + b reordenada como X = (Y – b) / a

donde:

Y = logaritmo del tiempo de activación (método cinético) o densidad óptica (método de criterio de valoración)

X: Método cinético: X = logaritmo de la concentración de endotoxinas (es necesario determinar el antilogaritmo de X para obtener la concentración de endotoxinas)

Método de criterio de valoración: X = concentración de endotoxinas

a = pendiente de la recta

b = ordenada en el origen

Multiplique la concentración de endotoxinas calculada a partir de la línea estándar por la dilución de la muestra para expresar la concentración en términos de la muestra original sin diluir.

Estos cálculos suelen realizarse mediante software de análisis de endotoxinas.

Interpretación

- Para que una prueba sea válida, la concentración de endotoxinas de los controles negativos (calculada por extrapolación de la curva estándar) debe ser significativamente inferior a la de la concentración del estándar más bajo.
- El coeficiente de correlación de la curva estándar incluida con la prueba debe tener un valor absoluto de 0,980 como mínimo.
- La media de la concentración de endotoxinas medida de los controles positivos (para la verificación de una curva archivada) debe encontrarse a un ±25% de la concentración nominal. Así, si la concentración del control positivo es de 0,125 UE/mL, la concentración medida debe estar entre 0,09375 y 0,15625 UE/mL.
- Sólo pueden notificarse concentraciones de endotoxinas que estén dentro del intervalo que haya entre las concentraciones más alta y más baja de endotoxina estándar. Los resultados de las muestras que tengan concentraciones que estén fuera de este intervalo deben clasificarse como inferiores a la concentración del estándar más bajo (no detectables) o superiores a la concentración del estándar más alto. Si emplea el método de criterio de valoración, sólo pueden calcularse concentraciones de endotoxinas válidas a partir de valores de DO que se encuentren en la parte lineal de la curva estándar.
- Para demostrar que la muestra no interfiere significativamente con la reacción LAL-endotoxinas, la concentración de endotoxinas medida en el control de producto positivo debe estar dentro del intervalo comprendido entre el 50% y el 200% de la concentración nominal de endotoxinas añadidas durante el «enriquecimiento». Antes de determinar si el enriquecimiento se recupera dentro de estos límites, reste la concentración de endotoxinas medida en la muestra (no enriquecida). Por ejemplo, para poder considerarse libre de interferencias significativas, la concentración de endotoxinas medida en un control de producto positivo de 0,125 UE/mL (después de restar las endotoxinas presentes en la muestra no enriquecida) debe estar dentro del intervalo de 0,0625-0,25 UE/mL (del 50% al 200% de 0,125 UE/mL). Si la concentración de endotoxinas medida en la muestra no enriquecida es de 0,028 UE/mL y la del control de producto positivo es de 0,163 UE/mL, las endotoxinas atribuibles al enriquecimiento serán 0,163 – 0,028 = 0,135 UE/mL. Este valor está dentro del intervalo, por lo que, si se cumplen los demás requisitos necesarios, la prueba de la muestra es válida.

Limitaciones del procedimiento

El procedimiento está limitado por la magnitud de la capacidad de inhibición o potenciación de la muestra que se esté analizando. Si el procedimiento no puede validarse (1, 2) a una concentración de muestra superior a la concentración mínima válida (CMV), entonces la prueba de endotoxinas bacterianas que utiliza reactivo de LAL no puede sustituir a la prueba de pirógenos de la USP. La CMV se calcula de la forma siguiente:

donde *λ* está expresada en UE/mL, la dosis de la muestra está en unidades por kg de peso corporal, y el límite de tolerancia a endotoxinas está en UE/kg.

La dilución máxima válida (DMV) es la dilución de la muestra que contiene la CMV (1). Se calcula dividiendo la concentración inicial de la muestra entre la CMV.

El límite de tolerancia a endotoxinas es de 0,2 UE/kg en el caso de los fármacos intratecales, y de 5 UE/kg en el de los demás productos administrados por vía parenteral.

En el caso de los productos sanitarios, el límite se expresa por mL del volumen de extracción o de producto de enjuague obtenido de la forma descrita en la USP (18) sobre la base de los límites para los productos sanitarios. El límite para los productos sanitarios que no entran en contacto con el líquido cefalorraquídeo es de 20 UE/producto, y para los que sí entran en contacto con dicho líquido, de 2,15 UE/producto. El límite para los productos sanitarios líquidos es el mismo que para los fármacos, según las pautas de la FDA (1).

Algunas proteasas de serina (p. ej., la tripsina o los factores sanguíneos activados) producirán resultados positivos falsos a menos que se desnaturalicen (p. ej., mediante tratamiento con calor) antes del análisis. Los materiales de color amarillo, como el suero animal, la albúmina y el plasma, pueden interferir en el análisis cromogénico basado en la pNA. Para analizar estos productos, utilice el análisis de diazoacoplamiento (Associates of Cape Cod, Inc., número de catálogo CD060). El exceso de turbidez de una muestra también puede interferir en la prueba.

Valores esperados

Las endotoxinas presentes en las muestras pueden cuantificarse dentro del intervalo de concentraciones de endotoxina estándar empleado para elaborar la curva estándar. Si es necesario diluir la muestra para evitar la inhibición o la potenciación, la cantidad mínima de endotoxinas que puede detectarse aumentará proporcionalmente. Los materiales derivados de fuentes biológicas, incluso después de la purificación bioquímica, aún pueden contener concentraciones mensurables de endotoxinas. El agua obtenida por destilación, ósmosis inversa o ultrafiltración puede contener una cantidad de endotoxinas inferior a la detectable, siempre que el proceso de purificación funcione correctamente y que el agua no resulte contaminada después de la producción.

Bibliografía

- Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
- Bacterial Endotoxins Test, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia (current revision), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.
- Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.
- Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.
- 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.
- 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.
- Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
- 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.
- 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.
- 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.
- Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
- 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.
- Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125- 136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.
- Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by Limulus Amebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419.
- Tsujii, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.
- 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.
- Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP; current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Nuestro personal experto comentará gustosamente con usted los aspectos prácticos y teóricos de la prueba del LAL. No dude en llamar si desea hacer alguna pregunta sobre el uso del Pyrochrome®. Sustituiremos cualquiera de nuestros productos que no cumpla las especificaciones del producto; póngase en contacto con el Servicio de Atención al Cliente antes de devolver un producto.