

Lisado de amebocitos de *Limulus*

PYROTELL® MTV

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
	PN000858 rev6 04 ene 2019

Vial multianálisis Pyrotell®

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

El análisis de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) puede utilizarse como sustituto del análisis de pirógenos (análisis de tularemia) de la Farmacopea Estadounidense (USP) para 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». El análisis de LAL está recomendado para la cuantificación de endotoxinas en materias primas utilizadas en la producción, incluida el agua, 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.

Resumen del análisis

El lisado de amebocitos de *Limulus* es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) procedentes del cangrejo herradura, *Limulus polyphemus*. El análisis de LAL se lleva a cabo añadiendo 0,1 mL de Pyrotell reconstituido a 0,1 mL de la muestra de análisis en un tubo de reacción de vidrio de cal sodada despirogenado de 10 x 75 mm. La solución de reacción se mezcla bien y se coloca inmediatamente en una incubadora de bloque seco o en un baño María de agua no circulante a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 60 ± 2 minutos. Una vez transcurrido el periodo de incubación, el tubo se saca de la incubadora y se invierte. Si se ha formado un gel y este permanece intacto en el fondo del tubo de reacción tras la inversión de 180° , el análisis es positivo; la concentración de endotoxina en el tubo es igual o mayor que la sensibilidad de Pyrotell. Todos los demás estados de la mezcla de reacción suponen un análisis negativo que indica que la concentración de la endotoxina es inferior a la sensibilidad de Pyrotell. El análisis es negativo incluso si se ha formado un gel, pero este se rompe o se despegua con la inversión. El análisis de LAL es rápido, específico, fácil de realizar y sumamente sensible. Pyrotell puede detectar concentraciones tan bajas como de 0,03 unidades de endotoxina (UE) por mL utilizando la técnica del coágulo de gel.

Historia y principio biológico

Howell describió la coagulación de la sangre de *Limulus* en 1885 (3). En la década de 1950, Bang, en el Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA (EE.UU.), descubrió que las bacterias gramnegativas hacen que la sangre de *Limulus* se coagule (4). Levin y Bang determinaron más tarde que la reacción es enzimática y que las enzimas se localizan en gránulos en los amebocitos (5). Demostraron que la coagulación la inicia un componente estructural exclusivo de la pared celular bacteriana llamado endotoxina o lipopolisacárido (6). Los conocimientos actuales incluyen que la reacción que lleva a la formación de coágulo es 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 para formar la matriz de gel. En la literatura profesional está disponible más información sobre la reacción del LAL y las aplicaciones (7, 8, 9).

Reactivo

El lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) Pyrotell está envasado en forma liofilizada en tamaños de llenado de 2 y 5 mL/vial.

Associates of Cape Cod, Inc., ofrece lotes individuales de Pyrotell en sensibilidades que van de 0,03 a 0,5 UE/mL sobre la base del estándar de referencia de endotoxina de la USP (denominado también endotoxina estándar de referencia o RSE [reference standard endotoxin]). La sensibilidad, λ , es la concentración de RSE mínima que produce un coágulo de gel firme en condiciones estándar. La sensibilidad del lote, UE/mL, está impresa en las etiquetas del vial y del envase. Especifique la sensibilidad deseada cuando haga un pedido.

Utilice Pyrotell solo para fines de diagnóstico in vitro. No lo utilice para la detección de endotoxemia. No se ha determinado la toxicidad de este reactivo; por tanto, debe tenerse precaución al manipular Pyrotell.

Reconstituya Pyrotell del modo siguiente:

1. Golpee suavemente el vial de Pyrotell para hacer que el Pyrotell suelto se vaya al fondo del vial. Retire el precinto corrugado y rompa el vacío levantando el tapón gris. No contamine la boca del vial. No inyecte a través del tapón ni reutilice este. El análisis no se verá afectado si queda una pequeña cantidad de LAL en el tapón. Cubra el vial con Parafilm «M»® (American National Can™) cuando no lo esté utilizando.
2. Reconstituya Pyrotell con agua con reactivo LAL (LAL Reagent Water, LRW, consulte «Reactivos de análisis») o un amortiguador compatible (de Associates of Cape Cod, Inc.). Añada 2,0 o 5,0 mL según se indique en la etiqueta del vial. El gránulo de LAL liofilizado se introducirá en la solución en unos minutos. Antes del uso, mezcle bien el contenido del vial para asegurar la homogeneidad. Mezclar con demasiada intensidad puede generar la formación de demasiada espuma, que puede provocar una pérdida de sensibilidad.

Condiciones de conservación

Pyrotell liofilizado es relativamente termoestable y, si se mantiene refrigerado, conservará la actividad completa hasta la fecha de caducidad de la etiqueta del vial. Tras recibir el producto, consérvelo a una temperatura de entre -20 y $+8^\circ\text{C}$. Las temperaturas inferiores a -20°C hacen que el tapón se encoja, lo que hará que se pierda el vacío y que Pyrotell pueda resultar contaminado. Las temperaturas superiores a 37°C pueden provocar un rápido deterioro de Pyrotell liofilizado como evidencia la pérdida de sensibilidad y un amarilleamiento notorio del producto. Pyrotell se envía con gel refrigerante en recipientes aislados para protegerlo de las temperaturas elevadas.

Pyrotell 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 flocculante o un color amarillo notorio indican deterioro.

Pyrotell 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 reconstituido se puede congelar una vez. El producto 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 aséptica en recipientes aprógenos. 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. Para determinar si el lote de recipientes es aceptable, pueden seleccionarse al azar recipientes y enjuagarse con un pequeño volumen de LRW (a temperatura ambiente durante una

hora), tras lo que puede analizarse el enjuague como si fuera una muestra.

El pH de la mezcla de reacción (muestra añadida a Pyrotell) debe estar entre 6 y 8. Ajuste el pH de la muestra con HCl o NaOH (libres de endotoxina detectable) o con amortiguador compatible (consulte el n.º 3 más abajo). Diluya el HCl o el NaOH concentrados con agua con reactivo LAL (LAL Reagent water, LRW) hasta obtener unos límites normales que no generen una dilución importante de la muestra del análisis cuando se ajuste. No ajuste el pH del agua o la solución salina no amortiguadas.

Las sustancias que desnaturalizan proteínas, quelan cationes, se unen a la endotoxina o alteran el estado hidrófobo de la endotoxina pueden interferir con el análisis. La interferencia se puede detectar como una recuperación de endotoxina significativamente superior o inferior a la prevista cuando se añade 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 programas 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 las muestras no estériles que se vayan a conservar o a enviar 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. Vial multianálisis Pyrotell (consulte la descripción y el método de reconstitución en el apartado incluido más arriba).
2. LRW, no se suministra con Pyrotell; se pide por separado. Pyrotell liofilizado se debe reconstituir con agua que no muestre ninguna endotoxina detectable en el análisis de LAL. Las fuentes recomendadas incluyen a Associates of Cape Cod, Inc., o agua estéril para inyección o irrigación de la USP (Water for Injection, WFI, sin bacteriostático). El límite de endotoxina de la WFI de la USP es de 0,25 UE/mL; por tanto, la WFI puede tener endotoxina detectable cuando se analiza con un Pyrotell más sensible. Para certificar un nuevo lote de agua como LRW, reconstituya el Pyrotell y haga diluciones de endotoxina estándar con el nuevo lote de agua para confirmar la sensibilidad de Pyrotell. Si se confirma la sensibilidad del lote y el control negativo no muestra un aumento de la viscosidad ni precipitación flocculante, el agua es adecuada para el uso. Utilice LRW para reconstituir Pyrotell y estándares de endotoxina y para diluir estándares de endotoxina y muestras de análisis.
3. Amortiguador, no suministrado con Pyrotell; se pide por separado en caso necesario. El amortiguador Pyrosol (n.º de ref. BR051 o BC554) o el amortiguador Glucashield™ (n.º de ref. GB051) se pueden usar en lugar de LRW para reconstituir Pyrotell para ayudar a superar un problema de pH de la muestra o una interferencia producida por los glucanos.
4. Endotoxina estándar, no suministrada con Pyrotell; se pide por separado. La endotoxina estándar de control (EEC), obtenida de Associates of Cape Cod, Inc., se utiliza para confirmar la sensibilidad de Pyrotell, 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 diferentes potencias (UE/ng) cuando se analizan con lotes distintos de Pyrotell. Solicite un certificado de análisis de la potencia de una EEC con un lote específico de Pyrotell.

Materiales y equipos (no suministrados)

1. Tubos de reacción, 10 x 75 mm, despirogenados, vidrio de cal sodada (n.º de cat. TS050). Algunas marcas muestran propiedades inhibitorias con ciertos lotes de Pyrotell.

Associates of Cape Cod, Inc., puede suministrar tubos despirogenados.

2. Baño María de agua no circulante o incubadora de bloque seco (n.º de cat. TH120) capaz de mantener una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
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 recomienda utilizar productos estériles desechables.
5. Agitadora tipo vortical.
6. Parafilm «M»®. El lado en contacto con el papel protector es habitualmente apirógeno.
7. Tubos de ensayo apirógenos con una capacidad adecuada 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. Homo de aire caliente con capacidad de 250°C para la despirogenación de materiales de vidrio. Los ajustes mínimos de tiempo y temperatura utilizados habitualmente son 30 minutos a 250°C (2, 11).

Controles

Los controles son necesarios para asegurar un análisis válido. Los procedimientos recomendados son detallados por la FDA (1) y la USP (2).

1. Controles de endotoxina

- a. Serie estándar de endotoxina. Prepare un nuevo grupo de diluciones en serie adecuadas a partir de la solución de partida de endotoxina cada día, y mezcle cada dilución en una agitadora vortical durante un mínimo de 30 segundos. Haga diluciones de forma que una serie final de diluciones dobles represente diferentes grados de sensibilidad (λ) de Pyrotell. Para confirmar la sensibilidad de Pyrotell se recomienda utilizar concentraciones de 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$. Para maximizar la exactitud, utilice el menor número de diluciones posible con volúmenes de pipeta adecuados.
- b. En algunas circunstancias pueden utilizarse controles positivos en ausencia de una serie de concentraciones estándar. Para obtener más detalles, consulte las directrices de la FDA (1) de «Análisis de rutina de medicamentos mediante el análisis de LAL». La concentración de control positivo deberá ser de 2λ .

- 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 final de la endotoxina añadida en la muestra de análisis debe ser de 2λ .

2. Controles negativos

Con cada lote de muestras que se analice deberán incluirse control o controles negativos de LRW. Durante la validación del producto o el análisis de inhibición/realce (1, 2), la muestra utilizada para diluir la endotoxina estándar también se trata como control negativo.

Preparación de muestras para el análisis de límites o el ensayo

Diluya la muestra hasta obtener la concentración requerida para realizar un análisis de límites (pasa/no pasa) o realice un ensayo analizando una serie de concentraciones (en «Resultados e interpretación» se ofrecen ejemplos de los dos tipos de análisis). Las diluciones pueden llevarse a cabo en tubos de ensayo y el volumen de análisis puede transferirse a los tubos de reacción, o las diluciones pueden llevarse a cabo directamente en los tubos de reacción para dejar el volumen de análisis, 0,1 mL, en cada tubo. La dilución analizada para un análisis de límites se determina a partir de la sensibilidad de Pyrotell y del límite de endotoxina correspondiente a la muestra. Consulte «Limitaciones del procedimiento» o las directrices de la FDA (1) para obtener una

explicación y determinar el cálculo de la concentración válida mínima (CVM) y de la dilución válida máxima (DVM).

Realización del análisis

Es necesaria una **técnica uniforme** para obtener resultados satisfactorios.

1. Añada 0,1 mL de Pyrotell reconstituido a cada tubo de reacción con 0,1 mL de muestra de análisis o de control. Utilice una pipeta graduada (con incrementos de 0,1 mL) o una pipeta automática o de repetición. Añada Pyrotell al control o los controles negativos primero, y la concentración de la más baja a la más alta en cada serie de análisis donde la contaminación cruzada de las muestras pueda ser un problema. Se recomienda utilizar una pipeta o una punta de pipeta nueva para cada introducción en el vial de Pyrotell. Agite bien la gradilla de tubos de 20 a 30 segundos para asegurar una buena homogeneización. Si solo hay unos pocos tubos, cada uno puede agitarse de 1 a 2 segundos en la agitadora vortical. Una causa habitual de análisis insatisfactorios es no mezclar de forma adecuada.

2. Coloque los tubos de reacción en un baño María o un baño seco a 37 ± 1 °C durante 60 ± 2 minutos. La reacción comienza cuando se añade LAL a la muestra de análisis, pero no procede a una velocidad óptima hasta que la mezcla alcanza los 37 °C. Si se está analizando en paralelo un gran número de muestras, los análisis pueden hacerse por lotes e iniciarse a intervalos que permitan la lectura de cada uno de ellos dentro del límite de tiempo.

No altere los tubos de reacción durante el periodo de incubación. La reacción de formación de gel es delicada y puede interrumpirse irreversiblemente si los tubos se manipulan, se agitan o se hacen vibrar. No utilice un baño María con un agitador ni con ninguna otra fuente de vibración. Sumerja los tubos por encima del nivel de la mezcla de reacción, pero no a una profundidad tal que floten o se muevan en las gradillas.

3. Retire y obtenga lecturas de los tubos de reacción de uno en uno. No seque los tubos con un paño ni los golpee contra los lados de la gradilla al retirarlos. Invierta el tubo con un movimiento suave; no detenga el movimiento de inversión antes de terminar esta a menos que sea obvio que no se ha formado el gel. El análisis se considera positivo cuando se ha formado un gel que no se despega cuando se invierte el tubo.

Resultados e interpretación

Ejemplo de serie de endotoxina estándar

Confirme la sensibilidad del Pyrotell y cualifique al laboratorio o al técnico realizando el análisis de LAL en una serie de concentraciones de endotoxina estándar conocidas (1, 2) que represente los diferentes grados de sensibilidad indicados en las etiquetas (esto es, 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$). En el caso de este ejemplo, la sensibilidad de Pyrotell (λ) es de 0,25 UE/mL:

Concentración de endotoxina	Resultado del análisis
0,5 UE/mL (2λ)	+
0,25 UE/mL (λ)	+
0,125 UE/mL ($0,5\lambda$)	-
0,06 UE/mL ($0,25\lambda$)	-
LRW (control negativo)	-

El criterio de valoración de este ensayo se define como la concentración más baja de endotoxina que da positivo en el análisis. La sensibilidad indicada en las etiquetas de Pyrotell se confirma si el criterio de valoración es λ más/menos una dilución doble. En este ejemplo, la concentración de endotoxina en el último tubo positivo de la serie es de 0,25 UE/mL o λ ; por lo tanto, la sensibilidad se confirma. El análisis sería válido (sensibilidad confirmada) si el criterio de valoración fuera de 0,125 a 0,5 UE/mL (el error del método). Para mostrar un criterio de valoración de 0,125 UE/mL, el nivel de 0,06 UE/mL debe estar presente en la serie y ser negativo.

Cuando se replica el ensayo de endotoxina, la sensibilidad se expresa como la media geométrica (MG) de las sensibilidad individuales:

$$MG = \text{antilog} ((\Sigma e)/f)$$

donde Σe = suma de los logaritmos de los criterios de valoración y f = número de criterios de valoración replicados.

El **control negativo** de LRW deberá dar negativo en el análisis. Si el control negativo se coagula, el LRW, el material de vidrio o Pyrotell están contaminados. La mezcla deberá ser transparente y no mostrar ningún aumento de la viscosidad. La precipitación flocculante o en «copos de nieve» indica una concentración de endotoxina inferior a la sensibilidad de Pyrotell.

En ausencia de la serie de endotoxinas (1) puede incluirse un **control positivo** con los análisis. El control positivo a 2λ es el nivel de 0,5 UE/mL en el ejemplo anterior. Si el control positivo da negativo, la sensibilidad de Pyrotell es inferior al doble de la sensibilidad indicada en las etiquetas y el análisis de la muestra no es válido. La pérdida de la sensibilidad puede indicar que Pyrotell se ha deteriorado, que la endotoxina ha perdido potencia (a menudo debido a la adsorción a la superficie del recipiente) o que el análisis no se ha llevado a cabo correctamente.

Ejemplo de un análisis de límites (pasa/no pasa)

Es posible analizar una concentración de una muestra con una sensibilidad dada de Pyrotell y hacer que el resultado indique si la muestra de análisis tiene o no más o menos endotoxina que su límite. En este ejemplo, la concentración de la muestra es de 1 mg/mL y el límite de endotoxina deseado o predeterminado para la muestra es de 3 UE/mg (consulte «Limitaciones del procedimiento»). El límite expresado en UE/mL,

$$(3 \text{ UE/mg}) (1 \text{ mg/mL}) = 3 \text{ UE/mL},$$

es superior a la sensibilidad de Pyrotell, 0,25 UE/mL, por lo que la muestra debe diluirse para realizar un análisis pasa/no pasa. Determine la dilución de la muestra que indicará que el análisis se pasa, <3 UE/mL, o no se pasa, ≥ 3 UE/mL, dividiendo el límite de la endotoxina en UE/mL por la sensibilidad del LAL:

$$3 \text{ UE/mL} / 0,25 \text{ UE/mL} = 12.$$

Combine una parte de muestra con 11 partes de LRW para conseguir la dilución 1:12 y lleve a cabo el análisis. El resultado indicará si la muestra pasa el análisis al límite de 3 UE/mL. Se incluyen controles de producto positivos durante el proceso de dilución de la muestra para descartar resultados negativos falsos.

Ejemplo de ensayo de una muestra

La endotoxina se cuantifica en un ensayo hallando el criterio de valoración en una serie de diluciones de la muestra. En el ejemplo siguiente, la muestra se diluye con LRW y las diluciones de la tabla se analizan; λ es 0,25 UE/mL. Los resultados se clasifican como positivos o negativos.

Dilución de la muestra	Resultado del análisis
sin diluir	+
1:2	+
1:4	+
1:8	-
1:16	-
1:32	-
control negativo	-

Para calcular la concentración de endotoxina en la muestra, multiplique la sensibilidad de Pyrotell (λ) por el recíproco de la dilución al criterio de valoración:

$$\text{Conc.} = (\lambda)(4/1) = (0,25 \text{ UE/mL})(4) = 1 \text{ UE/mL}.$$

La concentración para los ensayos replicados se expresa como la media geométrica.

Para descartar resultados negativos falsos, debe haber presente un **control de producto positivo** (muestra a la que se ha añadido 2λ de endotoxina estándar) y este ha de dar positivo en el análisis. Si el control de producto positivo da negativo y el control positivo es positivo, la muestra está interfiriendo con el análisis de LAL (lo está inhibiendo). La muestra deberá volverse a analizar a una dilución mayor (que no supere la DVM; consulte «Limitaciones del procedimiento»).

Limitaciones del procedimiento

El procedimiento está limitado por la capacidad de la muestra para inhibir o realzar el análisis de LAL. Si el procedimiento no se puede validar (1, 2) 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 se calcula del modo siguiente:

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

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 (1) es de 0,2 UE/kg en el caso de los medicamentos administrados por vía intratecal y de 5 UE/kg en el de todas las demás vías parenterales. El límite de los productos sanitarios se expresa en mL de un volumen de extracción o enjuague obtenido del modo descrito en las directrices de la FDA (1). En el caso de los productos que entran en contacto con el líquido cefalorraquídeo, el límite es de 0,06 UE/mL; en el de los que no entran en contacto con dicho líquido, el límite es de 0,5 UE/mL. 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. Los materiales tales como la sangre, el suero y el plasma deberán tratarse para desactivar los inhibidores antes del análisis (12).

Valores previstos

La endotoxina puede cuantificarse si la concentración es mayor o igual que la sensibilidad de Pyrotell. Los materiales derivados de fuentes biológicas, incluso después de una purificación bioquímica, pueden contener 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.

Eficacia analítica específica

El error del método del coágulo de gel es más/menos una dilución doble al criterio de valoración del ensayo.

Bibliografía

- Análisis de endotoxinas bacterianas, USP actual.
- 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. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
- 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.
- Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.

8. 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.

9. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.

10. 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.

11. 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.

Nuestro experimentado personal estará encantado de comentar los aspectos prácticos y teóricos del análisis de LAL. Llame si tiene problemas utilizando Pyrotell. Sustituiremos todos nuestros productos que no cumplan las especificaciones del producto; antes de devolver un producto deberá notificarnos la devolución.