PIROGENOS EN INYECTABLES DE PEQUEÑO VOLUMEN PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Farmacia

Fdo. Carmen Lacasa Diaz

Visado en Pamplona, el 20 de Mayo de 1986.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

Prof. Dr. Felix Alvarez de la Vega

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra

PIROGENOS EN INYECTABLES DE PEQUEÑO VOLUMEN PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Farmacia

Fdo. Carmen Lacasa Díaz

Visado en Pamplona, el 20 de Mayo de 1986.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

F. Alvarez de la Vega.

Prof. Dr. Félix Alvarez de la Vega

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra

Deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. Felix Alvarez de la Vega y a la Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra por su continua solicitud y consejo durante la realización de este trabajo.

También deseo mostrar mi agradecimiento al Prof. Dr. Ramón Cisterna Cancer y al Dr. Carlos A. Villaverde Grote su inestimable cooperación y ayuda.

Así mismo agradezco:

Al Dr. Ignacio Moriyon, su orientación en la revisión bibliográfica.

A los Servicios de Bioquímica, Microbiología e Informática del Hospital Civil de Bilbao su colaboración en la realización de esta tesis.

A Mercedes Cánovas, Carmen Navarro y Mercedes Vidal de la Unidad de Trombosis y Arterioesclerosis del C.S.I.C. de Barcelona, su ayuda en la parte experimental.

A Jaime Jané, Jesús Lafuente y Aida de la Villa, su estímulo en el desarrollo del trabajo.

Y a todas las personas que de algún modo han contribuido a la realización de esta tesis, en particular mis compañeros del Servicio de Farmacia.

PIROGENOS EN INYECTABLES DE PEQUEÑO VOLUMEN PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Farmacia

Fdo. Carmen Lacasa Díaz

Visado en Pamplona, el 20 de Mayo de 1986.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

F. Alvarez de la Vega

Prof. Dr. Félix Alvarez de la Vega

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra

PIROGENOS EN INYECTABLES DE PEQUEÑO VOLUMEN PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Farmacia

Fdo. Carmen Lacasa Diaz

Visado en Pamplona, el 20 de Mayo de 1986.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

Prof. Dr. Felix Alvarez de la Vega

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra

Deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. Felix Alvarez de la Vega y a la Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra por su continua solicitud y consejo durante la realización de este trabajo.

También deseo mostrar mi agradecimiento al Prof. Dr. Ramón Cisterna Cancer y al Dr. Carlos A. Villaverde Grote su inestimable cooperación y ayuda.

Así mismo agradezco:

Al Dr. Ignacio Moriyon, su orientación en la revisión bibliográfica.

A los Servicios de Bioquímica, Microbiología e Informática del Hospital Civil de Bilbao su colaboración en la realización de esta tesis.

A Mercedes Cánovas, Carmen Navarro y Mercedes Vidal de la Unidad de Trombosis y Arterioesclerosis del C.S.I.C. de Barcelona, su ayuda en la parte experimental.

A Jaime Jané, Jesús Lafuente y Aida de la Villa, su estímulo en el desarrollo del trabajo.

Y a todas las personas que de algún modo han contribuido a la realización de esta tesis, en particular mis compañeros del Servicio de Farmacia.

PIROGENOS EN INYECTABLES DE PEQUEÑO VOLUMEN PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

LEMA: PIROGENOS

PIROGENOS EN INYECTABLES DE PEQUEÑO VOLUMEN PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Farmacia

Fdo. Carmen Lacasa Díaz

Visado en Pamplona, el 20 de Mayo de 1986.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

F. Alvarez de la Vega.

Prof. Dr. Félix Alvarez de la Vega

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra

PIROGENOS EN INYECTABLES DE PEQUEÑO VOLUMEN PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Farmacia

Fdo. Carmen Lacasa Diaz

Visado en Pamplona, el 20 de Mayo de 1986.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

Prof. Dr. Felix Alvarez de la Vega

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra

Deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. Felix Alvarez de la Vega y a la Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra por su continua solicitud y consejo durante la realización de este trabajo.

También deseo mostrar mi agradecimiento al Prof. Dr. Ramón Cisterna Cancer y al Dr. Carlos A. Villaverde Grote su inestimable cooperación y ayuda.

Así mismo agradezco:

Al Dr. Ignacio Moriyon, su orientación en la revisión bibliográfica.

A los Servicios de Bioquímica, Microbiología e Informática del Hospital Civil de Bilbao su colaboración en la realización de esta tesis.

A Mercedes Cánovas, Carmen Navarro y Mercedes Vidal de la Unidad de Trombosis y Arterioesclerosis del C.S.I.C. de Barcelona, su ayuda en la parte experimental.

A Jaime Jané, Jesús Lafuente y Aida de la Villa, su estímulo en el desarrollo del trabajo.

Y a todas las personas que de algún modo han contribuido a la realización de esta tesis, en particular mis compañeros del Servicio de Farmacia.

PIROGENOS EN INYECTABLES DE PEQUEÑO VOLUMEN PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Farmacia

Fdo. Carmen Lacasa Díaz

Visado en Pamplona, el 20 de Mayo de 1986.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

F. Alvarez de la Vega.

Prof. Dr. Félix Alvarez de la Vega

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra

PIROGENOS EN INYECTABLES DE PEQUEÑO VOLUMEN PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Farmacia

Fdo. Carmen Lacasa Díaz

Visado en Pamplona, el 20 de Mayo de 1986.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

F. Alvarez de la Vega.

Prof. Dr. Félix Alvarez de la Vega

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra

PIROGENOS EN INYECTABLES DE PEQUEÑO VOLUMEN PREPARADOS EN FARMACIA DE HOSPITAL

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Farmacia

Fdo. Carmen Lacasa Diaz

Visado en Pamplona, el 20 de Mayo de 1986.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

Prof. Dr. Felix Alvarez de la Vega

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra

Deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. Felix Alvarez de la Vega y a la Prof. Dra. Pilar Ygartua Ayerra por su continua solicitud y consejo durante la realización de este trabajo.

También deseo mostrar mi agradecimiento al Prof. Dr. Ramón Cisterna Cancer y al Dr. Carlos A. Villaverde Grote su inestimable cooperación y ayuda.

Así mismo agradezco:

Al Dr. Ignacio Moriyon, su orientación en la revisión bibliográfica.

A los Servicios de Bioquímica, Microbiología e Informática del Hospital Civil de Bilbao su colaboración en la realización de esta tesis.

A Mercedes Cánovas, Carmen Navarro y Mercedes Vidal de la Unidad de Trombosis y Arterioesclerosis del C.S.I.C. de Barcelona, su ayuda en la parte experimental.

A Jaime Jané, Jesús Lafuente y Aida de la Villa, su estímulo en el desarrollo del trabajo.

Y a todas las personas que de algún modo han contribuido a la realización de esta tesis, en particular mis compañeros del Servicio de Farmacia.

SUMARIO

Página

I. INTRODUCCION

1. Pirógenos, aspectos generales

a. Membrana externa de las bacterias Gram-negativas 9

- Lipopolisacáridos 11

- Métodos de aislamiento 13

- Otros componentes de la membrana externa 16

b. Pirógenos y toxinas bacterianas

- Pirógenos exógenos 18

- Importancia farmacéutica 26

pg

- Pirógenos endógenos 26

- Efectos de los pirógenos endógenos 29

c. Actividad biológica de las endotoxinas

- Actividades generales 30

- Actividad pirogénica 34

d. Pirogenicidad y gelificación del LAL 36

2. Métodos de análisis "in vivo"

a. Valoración en diferentes modelos 40

- Conejo-epinefrina 40

- Embriones de pollo 41

- Ratones y ratas 41

b. Valoración en conejo

- Variables en el análisis 43

- Sensibilidad 49

- Tolerancia 50

- Normativa 51

3. Metodos de análisis "in vitro"

a. Agregación plaquetaria 62

b. Análisis microbiológico 63

c. Lisado de amebocitos de Limulus 64

pg

- Generalidades 64

- Interferencias 70

- Aplicaciones método LAL 76

- Comparación LAL-conejos 81

- Ventajas e inconvenientes 83

- Normativa 86

4. Objeto del trabajo 94

II. MATERIAL Y METODOS

A. Material 95

B. Métodos 98

1. Preparación de las muestras 98

2. Métodos de valoración 101

a. Recuento microbiológico 101

b. Análisis con lisado de amebocitos de Limulus 109

c. Análisis en conejos 119

d. Agregación plaquetaria 123

III. RESULTADOS

pg

1. Recuento microbiologico 127

2. Análisis con lisado de amebocitos de Limulus 135

3. Análisis en conejos 159

4. Agregación plaquetaria 176

IV. DISCUSION 185

V. CONCLUSIONES 203

VI. BIBLIOGRAFIA 207

I. INTRODUCCION

1. Pirógenos, aspectos generales

Segun Personeus (1973), el término pirógeno fue aplicado por primera vez por Burdon-Sanderson en 1876 a un extracto de carne pútrida, productor de fiebre. En los comienzos del siglo XX, al aumentar la administración intravenosa, se observó un aumento de las reacciones febriles severas.

Los términos "fiebre proteínica", "fiebre del suero", "fiebre del salvarsan" y "fiebre del agua del mar" se asociaron frecuentemente con los primeros inyectables. Los trabajos de Hort y Penfold en 1912 iniciaron los conocimientos reales de la fiebre por inyección, y la utilización de los conejos para su

estudio. Los estudios experimentales de Jona en 1916, Muller en 1911, Schmidt en 1920 y Rhymer en 1919 demostraron que sólo las soluciones estériles y libres de endotoxina no eran pirogénicas, no daban reacciones febriles (Personeus, 1973).

Sin embargo fué Seibert (1923, 1925) quien demostró que la fiebre por inyección tenia una etiología atribuible a productos bacterianos termoestables. Rademaker en 1930 confirmó el trabajo de Seibert y publicó un elaborado conjunto de instrucciones para preparar soluciones libres de pirógenos.

Co Tui y Schrift en 1942 demostraron la diferente capacidad de los microorganismos para producir pirógenos; y Probey y Pittman (1945) aislaron microorganismos de sangre y demostraron su capacidad pirogénica. El mecanismo de la acción pirogénica, la producción de fiebre, no se conoce con seguridad.

La farmacopea americana (USP XII) introdujo en 1942, por primera vez, un método de control de pirógenos de soluciones inyectables en conejo (Welch et al, 1943). El Code of Federal Regulations (CFR), en septiembre de 1945 dió las primeras normas de control de pirógenos y el método de análisis para la certificación de la penicilina. La farmacopea británica en 1948 introdujo el control de pirógenos en preparaciones parenterales (Weiss, 1977).

En 1970 produjo un gran impacto el método de detección de pirógenos en preparaciones parenterales mediante el lisado de amebocitos de Limulus. Ofrecía ventajas de sencillez y sensibilidad (Cooper, 1977).

Loeb en 1902 y Alsberg y Clark en 1908, estudiaron un animal de las costas noratlánticas llamado "cangrejo de las Molucas" o "cangrejo en herradura". Es un arácnido primitivo, con aspecto de crustáceo denominado Limulus polyphemus. Observaron que en condiciones precarias puede sufrir un proceso de infección microbiana, que si se generaliza produce una coagulación similar a la coagulación sanguinea. Este proceso se atribuye a los amebocitos, células del líquido circulante, capaces de sufrir aglutinación, agregación, degranulación y lisis (Lagodsky, 1979).

Hasta cincuenta años después no se realizan otros estudios. En 1956 Levin y Bang utilizaron el lisado de amebocitos de Limulus (LAL) y un extracto de endotoxina bacteriana; estos dos extractos unidos "in vitro" forman un gel, de modo similar a como se produce la coagulación en el animal infectado (Graham, 1978). Cooper et al (1971) describen un método de análisis de gelificación "in vitro". Daban como reacción positiva de la presencia de pirógenos, la aparición de gelificación cuando se

añadía al LAL el líquido problema (Lagodsky, 1979).

Actualmente se admite que dentro del grupo de las sustancias productoras de fiebre, las más importantes son las endotoxinas, lipopolisacáridos procedentes de la pared externa de las bacterias Gram-negativas. Menor importancia tienen las exotoxinas que provienen de bacterias Gram-positivas y son excretadas al medio (Dony, 1979).

a. Membrana externa de las bacterias Gram-negativas

En la figura 1 se representan de forma esquemática las cubiertas de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Lugtenberg y Van Alphen, 1983).

La membrana externa de las Gram-negativas tiene un espesor aproximado de 8 nm (Ingraham et al, 1983) y sus componentes principales son: lipopolisacáridos (LPS), proteinas y fosfolípidos. También tiene el llamado antígeno común de Enterobacteriáceas (ECA).

Lugtenberg y Van Alphen (1983) describen con detalle la situación actual de la investigación de los componentes de la membrana externa, su aislamiento y organización molecular de la membrana. Aquí interesa una visión general con algún detalle de los lipopolisacáridos a los que se atribuye la

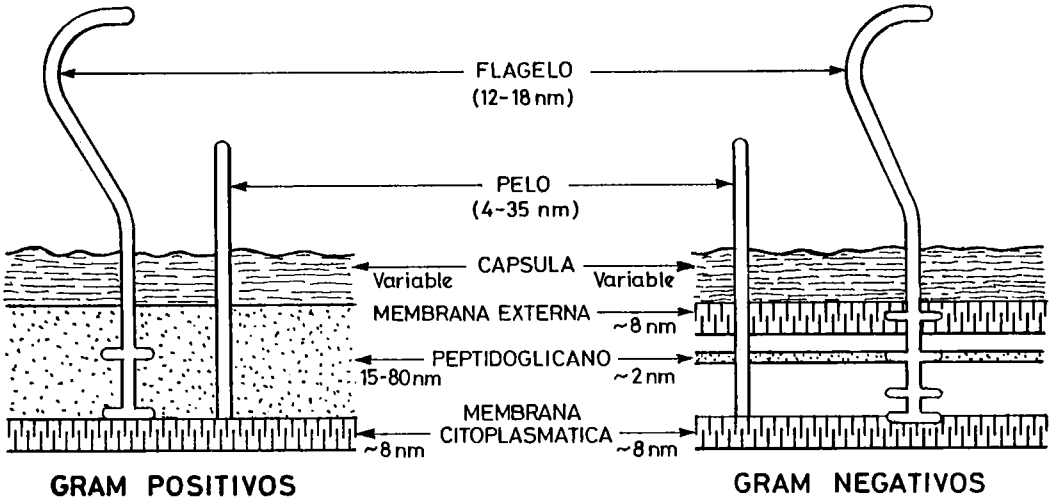


Fig 1. Comparación de la estructura de las cubiertas de de las bacterias gram-positivas y gram-negativas (Ingraham et al, 1983).

actividad pirogénica.

Existen todavía numerosos problemas por dilucidar en el esclarecimiento de la configuración, situación, funciones etc., de cada componente en las diferentes bacterias Gram-negativas y sus mutantes.

- Lipopolisacáridos.

La configuración del LPS de Salmonella typhimurium se representa en la figura 2. Consta de una parte hidrófoba, llamada lípido A y una parte hidrofílica. La parte hidrofílica es de naturaleza lipopolisacarídica y consta de un núcleo unido al lípido A y una cadena externa o antígeno "O". Los LPS de las Enterobacteriáceas contienen como azúcares específicos ácido 3-deoxi-D-manooctolugónico (KDO) y L-glicero-D-manoheptosa (Galanos et al,1977).

Las colonias de los mutantes sin antígeno "O" tienen aspecto rugoso (R), mientras que las cepas salvajes aspecto liso (S). Hay una gran variedad de LPS con modificaciones de la parte nuclear e incluso sin KDO. También varía el numero de unidades (desde ninguno a mas de 40) de 3 a 6 azucares que forman el antígeno "O" (Goldman y Leive, 1980). Esta propiedad se utiliza en la

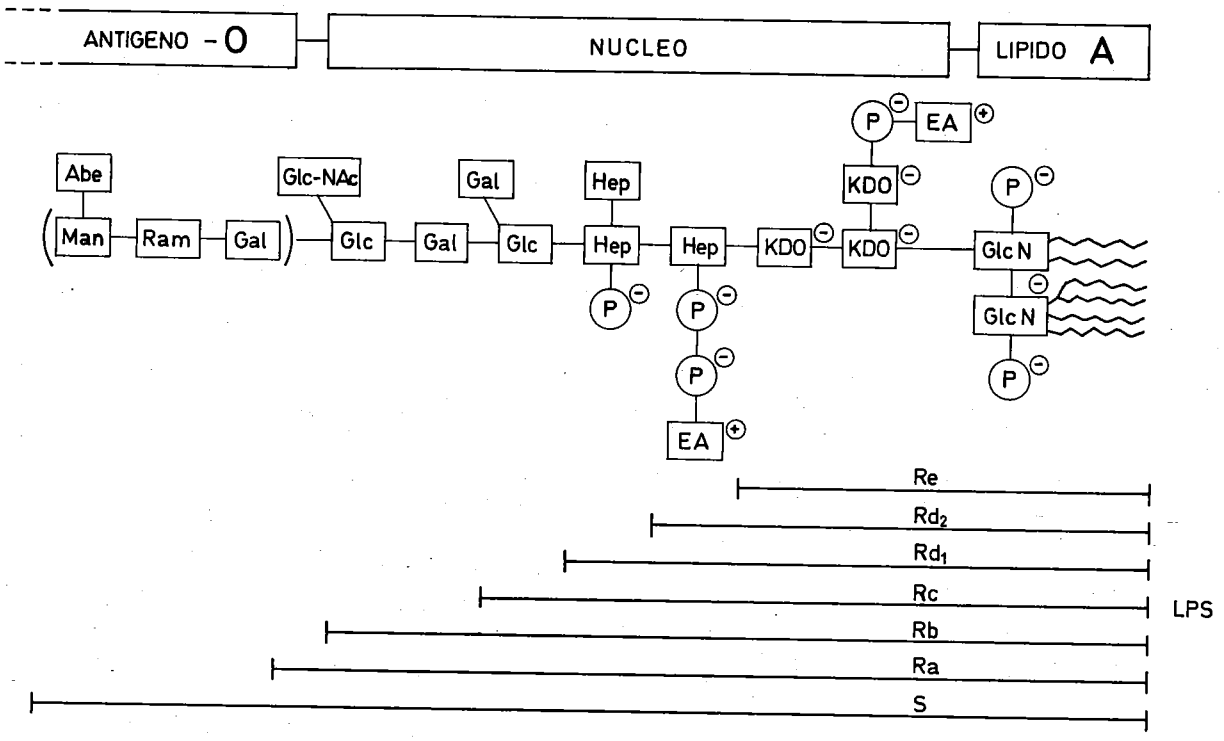


Fig 2. Representación esquemática de los varios LPS producidos por las cepas lisas (S) de Salmonella typhimurium y por varios mutantes rugosos (R) (Lugtenberg y Van Alphen, 1983). Man, manosa; Ram, ramnosa; Gal, galactosa; Abe, abecuosa; Glc, glucosa; Hep, L-glicero-D-manoheptosa; KDO, ácido 2-ceto-3-deoxioctolusónico; Glc N, glucosamina; Glc NAc, N-acetil-D-glucosamina; EA, etanolamina.

identificación de serotipos y otras técnicas serológicas. El EDTA puede extraer aproximadamente la mitad del LPS. Los cationes divalentes, calcio y magnesio tienen gran afinidad para el LPS (Leive, 1975).

- Métodos de aislamiento

El método clásico para el aislamiento de los LPS es el de fenol-agua (Westphal et al, 1952, Westphal y Jann, 1965): tratamiento de las bacterias secas con fenol al 45 % durante 5 minutos a 68°. Este método con pequeñas modificaciones da mejores resultados y se obtienen los LPS con mayor grado de pureza. Hay otros métodos como la separación con EDTA o butanol acuoso, pero proporcionan preparaciones fuertemente contaminadas con proteinas.

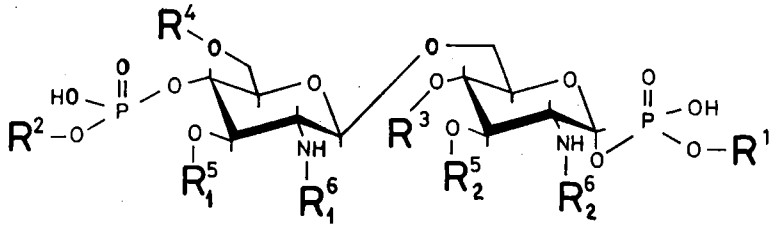
Debido a su naturaleza ambifílica, el LPS puede presentar diferentes estados de agregación según su contaminación con proteinas. Estos distintos estados de agregación son distinguibles por microscopia electrónica, apareciendo el LPS como túbulos, láminas o esferas (Lugtenberg y Van Alphen, 1983).

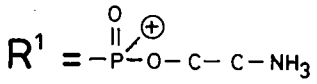
Su localización en la superficie celular explica que puedan ser liberados en ciertas condiciones al medio sin

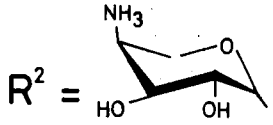
que haya necesariamente lisis de la célula bacteriana. La mayor parte de los resultados experimentales indican que la estructura responsable de las actividades biológicas de los LPS es el lípido A. El estado físico de los agregados moleculares de subunidades LPS, juega un papel determinante que condiciona la intensidad de las respuestas biológicas (Dony,1979).

El lípido A puede ser obtenido por hidrólisis ácida suave del LPS. La figura 3 da un esquema de la estructura general del lípido A. Se ha identificado como un disacárido difosfato β-(1'-6)-D-glucosamina en estudios en bacterias Gram-negativas, variando los radicales R1 a R6 para las diferentes bacterias. Estos radicales son conocidos en parte para las siguientes: Escherichia coli K-12, Vibrio cholerae, Yersinia enterocolitica, Proteus mirabilis, Salmonella minnesota, Chromobacterium violaceum, Rhodospirilum tenue, Fusobacterium nucleatum, Acinetobacter calcoaceticus y Xanthomonas sinensis (Rietschel et al, 1984). Para dilucidar exactamente la estructura de lípidos A no enterobacterianos, se requieren estudios posteriores.

El EDTA puede extraer aproximadamente la mitad del LPS. Los cationes divalentes, calcio y magnesio tienen gran

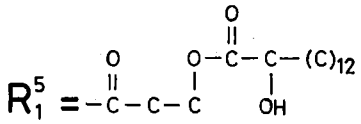


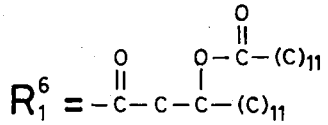


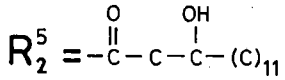












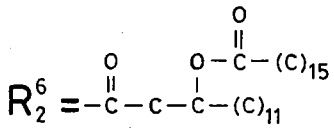


Fig. 3: Estructura más frecuente del lípido A (modificada de Rietschel et al, 1984).

afinidad para el LPS (Leive, 1976).

- Otros componentes de la membrana externa

Proteinas. A diferencia de la membrana citoplasmática, la membrana externa contiene tan sólo un reducido número de especies diferentes de proteinas (Laemmli, 1970; Neville, 1971; Uemura y Mizushima, 1975; Pugsley y Schnaitman, 1978). En condiciones normales de cultivo 3 o 4 proteinas representan el 90% de su contenido proteico total y son conocidas como proteinas principales de membrana externa. En E. coli son: las póricas o proteinas matriciales (figura 4, PP), la proteina OmpA (outer membrane protein) de función no bien determinada (figura 4, A) y la lipoproteina de Braun, numéricamente la más abundante en toda la bacteria, y que por estar constantemente unida al peptidoglicano (figura 4, PG) contribuye a mantener la integridad estructural de la membrana externa.

Entre las dos membranas se encuentra un espacio llamado periplásmico. En él se encuentran libres diversas proteinas de captación de sustrato (BP).

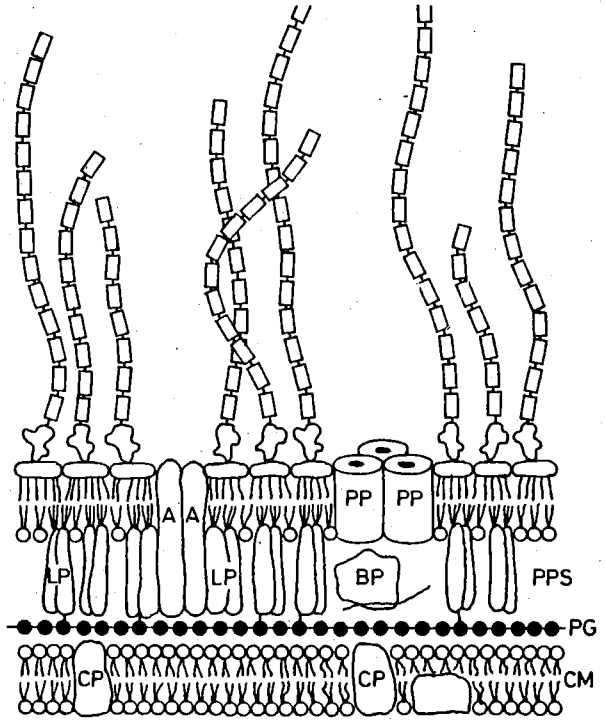


Fig 4. Organización molecular de la membrana de Enterobacteriáceas. CM (membrana citoplasmática), PPS (espacio periplásmico o periplasmic space), BP (proteinas de captación de sustrato), CP (proteina de transporte o carrier protein), (Mannel y Mayer, 1978). Ver texto.

b. Pirógenos y toxinas bacterianas.

La "fiebre por inyección" se explicó porque los inyectables estaban contaminados con bacterias Gram-negativas, que contenian lipopolisacárido bacteriano (Atkins y Bodel, 1979).

El LPS resiste al autoclavado, los disolventes orgánicos, los ácidos, el etanol y los líquidos esterilizantes (Elin y Wolff, 1973), pero hay muchas sustancias que no lo contienen y que producen fiebre en humanos y animales de experimentación. Estas sustancias junto con los LPS son consideradas pirógenos exógenos.

- Pirógenos exógenos

Son agentes pirogénicos procedentes del exterior del huesped. Hoy se ha establecido con claridad que el pirógeno exógeno produce fiebre por su capacidad para inducir la síntesis y liberación de pirógeno endógeno (PE) de las células fagociticas del huesped (Dinarello y Wolff, 1978). Una definición más precisa por tanto para pirógeno exógeno será: una sustancia que induce la producción de pirógeno endógeno. En la tabla 1 se resumen los principales pirógenos exógenos que inducen la síntesis de pirógeno endógeno.

Tabla 1. Pirógenos exógenos que inducen la producción de pirógeno endógeno (Dinarello y Wolff, 1982)

Pirógeno exógeno	Sustancia pirogénica	Mecanismo inducción pirógeno endógeno
Virus	Virus completo	Infección celular
	Hemaglutinina	Función hemaglutinante
Bacterias Gram-pos.	Bacteria completa	Fagocitosis
	Peptidoglicanos	Toxicidad ?
	Acidos teicoicos	Antigénico? Toxicidad?
	Exotoxinas	Toxicidad
	Enterotoxinas	Toxicidad
	Proteinas	Antigénico
	Toxinas Eritrogénicas	Toxicidad
Bacterias Gram neg.	Bacteria completa	Fagocitosis
	Peptidoglicano	Toxicidad?
	LPS	Toxicidad y Antigénico
	Lipido A	Toxicidad
Micobacterias	Bacteria completa	Fagocitosis
	Peptidoglicanos	Toxicidad?
	Polisacárido(OT)	Antigénico
	Proteinas (OT y PPD)	Antigénico
Hongos	Organismo completo	Fagocitosis
	Polisacarido capsular	Toxicidad
	Proteinas	Antigénico

OT, old tuberculin (tuberculina antigua); PPD, purified protein derivative (derivado proteico purificado).

Tabla 1 (Continuación)

Pirógeno exógeno	Sustancia pirogénica	Mecanismo inducción pirógeno endógeno
Antígenos no microbianos	SAB	Mediada por anticuerpos
	SAH	"
	BCG	Mediada por células
	Ovoalbumina	"
	Penicilina	Mediada por anticuerpos
Esteroides pirogénicos	Etiocolanolona	?
	5-β-Androstano-3-α-ol-17-ona	?
	5-β-Pregnano-3-α-ol-20-ona	?
	Acido litocólico	?
Polinucleótidos	Poli I: Poli C	Doble cadena RNA
Antineoplásicos	Bleomicina	Rotura DNA ?
Alcaloides de plantas	Colchicina	Impiden la formación del microtúbulo
	Vinblastina	
Adyuvantes	MDP	Toxicidad?

SAB, bovin serum albumin (seroalbúmina bovina); SAH, human serum albumin (seroalbúmina humana); BCG, bacilo de Calmette Guerin; poli I : poli C: ácido poliinosínico - policitidílico; MDP, muramildipéptido.

Virus. Varios virus Coxsackie y Echo asi como diferentes vacunas virales producen fiebre (Linnemann et al, 1974; Buynak et al, 1969). Para producir fiebre el virus debe tener tambien capacidad hemaglutinante (Kanoh y Kawasaki, 1966).

Bacterias Gram-positivas. Pueden producir fiebre por uno de los tres mecanismos siguientes: Fagocitosis de los organismos intactos por los leucocitos, lo cual induce la síntesis de PE, al igual que las particulas microbianas la inducen por si mismas (Atkins y Freedman, 1963). Producción y liberación de exotoxinas solubles que en el caso de los estafilococos se han aislado dos polipéptidos pirogénicos en conejo en dosis de 1-10 mcg/kg; en el caso de los estreptococos grupo A la toxina eritrogénica con cuatro tipos antigenicamente diferentes que producen fiebre por liberación de PE (Dinarello y Wolff, 1982). Respuestas tóxicas o inmunológicas del huesped a componentes pirogénicos de la pared celular como los peptidoglicanos, que al igual que los LPS de los Gram-negativos producen fiebre, desencadenan la reacción de Schwartzman, inducen resistencia no específica a la infección y colapso cardiovascular a dosis altas; pero

existe especifidad inmunológica para los distintos peptidoglicanos en la reaccion febril, mientras que la pirogenicidad del LPS bacteriano es generalmente no específica (Rotta, 1975).

Otros componentes de la pared celular de las bacterias Gram-positivas que también producen fiebre son los ácidos teicoicos (Atkins y Morse, 1967), proteinas y polisacáridos que forman complejos con anticuerpos específicos (Bodel y Atkins,1965).

Bacterias Gram-negativas. Los LPS son pirógenos muy potentes; la fiebre que produce el LPS está mediada por el PE. El mecanismo por el cual los LPS activan los leucocitos fagocíticos para producir PE no esta dilucidado. Se admite que la propiedad pirogénica del LPS reside en la fracción lípido A. Se han realizado diferentes estudios para la identificación de puntos activos más específicos dentro del lípido A (Dinarello y Wolff, 1982).

Micobacterias. El PE en la tuberculosis puede producirse por la interacción entre el microorganismo y las células fagocíticas que parasita, el granuloma reactivo o la reacción sistémica a los productos de la micobacteria.

Para estudiar el mecanismo de producción de PE se han inyectado i.v. a conejos y cobayas infectados con BCG, preparaciones de OT que es un filtrado de Mycobacterium tuberculosis autoclavado y que contiene componentes de la pared celular, polisacáridos y proteinas, y de PPD (purified protein derivative) que contiene sobre todo proteinas. La capacidad de OT y PPD para producir fiebre se ha relacionado con el estado de hipersensibilidad del huesped (Hall y Atkins, 1959). Parece que los anticuerpos a la tuberculina pueden sensibilizar el granulocito, el cual a su vez libera PE cuando es activado por OT (Atkins y Heijn, 1965).

Hongos. Las infecciones sistémicas micóticas causan fiebre aunque las infecciones por hongos localizadas no la producen. Ejemplos del primer caso son las infecciones pulmonares por Coccidioides inmitis y Cryptococcus. La fiebre puede estar producida por las células o por los productos fúngicos. (Salvin et al, 1965).

No se produce tolerancia con inyecciones repetidas de celulas fúngicas sino que aumenta la respuesta febril (Braude et al, 1960). Sin embargo los productos fúngicos sí producen tolerancia tras repetidas inyecciones. Para

Cryptococcus se han aislado dos fracciones pirogénicas: un polisacárido capsular, pirogénico en conejo por estímulo de los fagocitos y una fracción proteica que produce fiebre por mecanismo antigénico, pues sólo la produce en conejos previamente sensibilizados a productos de los criptococos (Haley et al, 1966).

Antígenos no microbianos. Se han diferenciado dos fenómenos: la fiebre mediada por anticuerpos en la cual es necesario que esté presente un anticuerpo específico para la pirogenicidad del antígeno y que se ha demostrado en estudios sobre la pirogenicidad de la seroalbúmina bovina (SAB) (Farr, 1959), la seroalbúmina humana (SAH) (Mott y Wolff, 1966) y la penicilina (Chusid y Atkins, 1972); y un segundo tipo de fiebre mediada por celulas sensibilizadas mostrada en estudios con oválbumina (Atkins y Francis, 1978).

Esteroides pirogénicos. La etiocolanolona es un esteroide pirogénico en humanos pero no en conejos, que produce fiebre, escalofrios, mialgias y dolor en el lugar de la inyección con un periodo de latencia de 8 a 12 horas (Wolff et al, 1967). La incubación de etiocolanolona con leucocitos produjo liberación de EP (Bodel y Dillard, 1968).

Polinucleótidos. El ácido poliinosínico - policitidílico (poli I: poli C) que es un RNA sintético es un potente pirógeno en animales y humanos y si se inactiva por ribonucleasa pierde su capacidad pirogénica (Nordlund et al, 1970).

Colchicina y Vinblastina. Aunque no producen fiebre en animales y conejos, induce la formación de PE por los fagocitos sanguíneos "in vitro". Su mecanismo se sugiere que podría ser la inhibición de la formación de los microtúbulos celulares (Bodel, 1976).

Bleomicina. Produce reacciones febriles agudas después de la inyección i.v. y es pirogénica en conejos (Rudders, 1972).

Adyuvantes. Se ha identificado una subunidad de peptidoglicano de Mycobacterium smegmatis y se ha sintetizado, correspondiendo al compuesto N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) y tiene todas las propiedades inmunológicas del adjuvante de la micobacteria. El MDP induce la síntesis de PE en fagocitos. La estructura mínima esencial para pirogenicidad parece ser el dipéptido L-alanil-D-isoglutamina y la molécula completa es un pirógeno más potente (Dinarello y Wolff, 1978; Masek et al, 1978).

- Importancia farmaceútica.

Es bien conocida la importancia que se ha dado a los pirógenos en inyectables IV. Las bacterias vivas son mas pirogénicas que las que han sido destruidas por el calor. Pero el proceso de destrucción por calor produce una más pronta liberación de sustancias pirogénicas. El crecimiento bacteriano en una solución inyectable la hace marcadamente pirogénica. Esto se debe a un aumento de productos metabólicos y a otros factores (Personeus, 1973).

Pearson et al (1982) compararon la pirogenicidad de endotoxinas de referencia con endotoxinas de gérmenes aislados en las plantas de fabricación; concluían que estas últimas eran menos potentes tanto en conejos como para gelificar el LAL. Por tanto las preparaciones de endotoxinas muy purificadas deberán ser utilizadas como estandar, pero no absoluto.

- Pirógenos endógenos.

Son proteinas producidas por los leucocitos y llamadas o bien pirógeno leucocítico (LP) o pirógeno endógeno (PE). Estos términos incluyen multiples péptidos endógenos del

sistema reticuloendotelial de origen celular que participan en la aparición de fiebre (Gander, 1982).

La comprensión del papel del PE en la fiebre ha sido lenta a causa de la dificultad de su análisis. Los primeros métodos se derivaban del ensayo en conejos pero era dificil medir la respuesta a una dosis dada de PE, pues variaba en distintos grupos de conejos. También es problemática la contaminación del PE con LPS que puede enmascarar las respuestas (Atkins y Bodel, 1974). Actualmente se ha desarrollado un método de radioinmunovaloración para el PE que parece hará más sencilla la comprensión del mecanismo de producción de fiebre (Dinarello et al, 1977).

Atkins y Bodel en 1974 y Hahn et al en 1967 observaron que el pirógeno endógeno se producía por los fagocitos que tienen receptores para inmunoglobulinas y complemento, exudados peritoneales y macrófagos del pulmón. Actualmente se admite que el PE se produce por una activación debida a la endotoxina, bacteria o fagocitosis de particulas inertes y síntesis de RNA y proteinas en los leucocitos (Dinarello, 1980). Parece que los PE del hombre o del conejo contienen dos moléculas pirogénicas. Una de estas

es una proteina de 15.000 dalton la cual predomina en las células del exudado peritoneal del conejo y la otra es una proteina de 45.000 dalton aislada de los monocitos humanos (Bodel, 1970).

Murphy et al (1981) identificaron pirógenos endógenos en conejos: uno de ellos es una proteina con un punto isoeléctrico (pI) de 7.3 y el otro era un conjunto de proteinas con valores de pI de 4.5 a 5. El pirógeno de pI 7.3 contenía un grupo -SH que era esencial para su actividad biológica. Ambos pirógenos daban resultados negativos en el análisis LAL.

A pesar de más de tres décadas de estudio los mediadores endógenos no han sido identificados con precisión ya que la necesidad de obtener mediadores "in vitro" de células fagocíticas vivas, está limitada por la baja producción (Beisel, 1983).

Flynn et al (1982) identificaron fagocitos mononucleares en placentas humanas como fuente de producción de mediadores y quizás las bajas producciones actuales puedan ser superadas.

- Efectos de los pirógenos endógenos

En estados febriles se produce un aumento de la proteolisis que es desencadenado por el PE al estimular la producción de prostaglandinas. Estas observaciones se han realizado incubando músculos de rata con PE y midiendo el grado de proteolisis por las concentraciones de aminoácidos libres en el medio (Baracos et al, 1983; Clowes et al, 1983).

La liberación del mediador activa un mecanismo para generar los aminoácidos libres necesarios para las defensas del huesped. En casos de traumatismo severo, infección o inflamación, el aumento de la proteolisis muscular es de valor para la supervivencia (Powanda y Beisel, 1982).

Beisel (1983) indica otras acciones de los mediadores endógenos demostradas en cultivos celulares o preparaciones tisulares: liberación de neutrófilos por la médula ósea, toma hepática de hierro, cinc y aminoácidos, síntesis hepática de enzimas intracelulares y proteinas quelantes de metales y estimulación de fagocitos y linfocitos.

Hoffman-Goetz et al (1981) estudiaron la capacidad del PE,

obtenido de pacientes malnutridos con marasmo (deprivación calórica) o kwashiokor (malnutrición proteica) de inducir fiebre en conejos. El PE se obtuvo de leucocitos de sangre periférica de estos pacientes estimulados "in vitro". El PE obtenido de los pacientes con malnutrición proteica produjo menos fiebre en los conejos, que el obtenido de los pacientes una vez tratados con nutrición parenteral total y que el obtenido de personas sanas. Sugerían que la síntesis de PE por los leucocitos puede ser inhibida por circunstancias que interfieran con la síntesis de RNA y proteinas. Estos resultados pueden corroborar impresiones clínicas anecdóticas anteriores, que sugerían que la sepsis por Gram-negativos puede cursar de forma afebril en niños malnutridos, comparado con la misma infección en niños nutridos normalmente (Scrimshaw et al, 1968; Brenton et al, 1967).

c. Actividad biológica de las endotoxinas

- Actividades generales

Las actividades biológicas de los LPS se recogen en la tabla 2; dependen de las propiedades físicas y químicas de la preparación de LPS y del método experimental utilizado. La mayoría han sido descritas para unos pocos tipos bien

Tabla 2: Actividades biológicas del LPS de enterobacterias (Moreno, 1980; Colucci et al, 1985; Clowes et al, 1983; Karanicolas, 1977)

Tóxicas:

actividad biológica	estructura responsable	referencias
Aborto	?	Rieder y Thomas (1960)
Adipsia, afagia, diarrea	?	Marshall (1964)
Agregación plaquetaria	lípido A	Cohen y Gardner (1966)
Necrosis médula ósea	lípido A	Galanos et al (1972)
Citotóxica macrófagos	?	Kessel y Braun (1965)
Disminución peso timo	?	Baroni et al (1976)
Hipoferremia	?	Kampschmidt y Upchurch (1962)
Hipotensión	lípido A	Ulevitch y Cochrane (1978)
Toxicidad letal	lípido A	Galanos et al (1972)
Leucopenia y leucocitosis	lípido A	Leong et al (1970)
Gelificación LAL	?	Yin et al (1972)
Aumento pirogenicidad BCG	lípido A	Galanos et al (1972)
Efecto Schwartzman	LPS completo	Galanos et al (1979) Kasai (1966)
Aumento toxicidad BCG	lípido A	Galanos (1975) Peavy et al (1979)
Necrosis tumoral	lípido A	Nigan (1975)
Meningitis aséptica	?	Cooper y Harbert (1975)
Peritonitis aséptica	?	Karanicolas et al (1977)
Pirogenicidad	lípido A	Luderitz et al (1973)
Inhibición fibrinolisis	?	Colucci et al (1985)
No tóxicas		
a) inmunológicas		
Capacidad adyuvante	lípido A	Skidmore et al (1975)
Mitógena linfocitos B	lípido A	Chiller et al (1973)
Unión a membranas celulares	lípido A	Kabir et al (1978)
Aumento fagocitosis	?	Kabir et al (1978)
Antígeno especifico de grupo	núcleo-lípido A	Galanos et al (1971) Johns et al (1977)
Síntesis IgG en ratas recien nacidas	lípido A	Kolb et al (1974)
Activación policlonal células B	lípido A	Anderson et al (1972)
Activación macrófagos	lípido A	Alexander y Evans (1971)
Antígeno especifico de especie	cadena "O"	Poe y Michael (1976)
Antígeno timo-independiente	polímero LPS	Marshall (1964)

Tabla 2. (continuación)

actividad biológica	estructura responsable	referencias
b) protección no especifica		
Aumento resistencia	lípido A	Galanos (1975)
Protección frente a rayos X	núcleo	Nowotny et al (1975)
Tolerancia a la endotoxina	lípido A	Greisman y Hornick (1976)
Aumento proteolisis	?	Clowes et al (1983)
c) inducción de sustancias biologicamente activas		
Activación sistema adenilciclasa	lípido A	Kabir et al (1978)
Aumento reactividad a epinefrina	lípido A	Galanos (1975)
Producción interferon	?	Youngner et al (1973)
Factor activador de leucocitos	?	Gery et al (1972)
Producción de kinina	?	Ward y Johnson (1975)
Sintesis de prostaglandinas	lípido A	Dey et al (1974)
Liberación cortisol endógeno	?	Baroni et al (1976)
Liberación hidrolasas lisosomales	?	Cline et al (1968)
Liberacion vasoaminas	?	Urbascheck y Nowotny (1968) Kabir et al (1978)
d) acción sobre proteinas séricas		
Unión a proteinas séricas	?	Oroszlan et al (1966)
Activación complemento via clásica	lípido A	Cooper y Morrison (1978)
Activación complemento via alternativa	cadena "O"	Morrison y Kline (1977)
Activación factor Hageman	lípido A	Kabir et al (1978)
Activador del plasminógeno	lípido A	Galanos (1975) Kabir et al (1978)

conocidos de LPS (Salmonella y E. coli) y en un número limitado de sistemas biológicos (ratones y conejos). Por esta razón es dificil tener una perspectiva clara de todas las actividades que esta molécula puede producir (Moreno, 1980). A pesar de los muchos efectos biológicos que producen las endotoxinas bacterianas, su papel en la patogenia está poco definido (Berry, 1975; Kass et al 1973; Shands, 1975).

Algunos de los efectos de las endotoxinas han sido relacionados con los mediadores endógenos en el test animal, tales como la activación del sistema de complemento (Ward y Johnson, 1975) activación del sistema de coagulación (Galanos, 1975) y liberación de PE de los leucocitos (Atkins y Francis, 1973).

La mayor parte de las actividades biológicas producidas por el LPS pueden estar relacionadas a una estructura específica de la molécula. Se ha observado que el principio endotóxico más importante del LPS es el lípido A. Cuando se destruye el lípido A por hidrólisis alcalina, la actividad endotóxica del LPS se pierde (Nowotny et al, 1975); sin embargo cuando el lípido A se aisla del LPS por hidrólisis ácida suave y se solubiliza

con una proteina tal como albúmina sérica bovina (ASB), la mayoría de sus acciones biológicas son comparables al LPS completo. Solo unas pocas acciones biológicas se han asociado al polisacárido "O" o al núcleo. El estado de agregación de los LPS modula algunas actividades biológicas (Galanos y Luderitz, 1976).

Los estudios sobre el LPS de bacterias diferentes de las Enterobacteriáceas (Galanos et al, 1977), han demostrado que estas moléculas pueden variar no solo en estructura química y física sino que también tienen diferentes propiedades biológicas.

- Actividad pirogénica

  La respuesta febril típica en conejos al LPS comienza 15-30 minutos despues de la inyección intravenosa. La fiebre es bifásica con dos picos de elevación de temperatura, el primero se produce 90 minutos después y el segundo a las 3 horas. Si se disminuye la dosis de endotoxina puede producirse una fiebre monofásica (Wolff et al, 1965).

  En el hombre la respuesta al LPS es una fiebre monofásica; es más sensible que el conejo (Greisman y Hornick, 1969; Wolff et al, 1973). La fiebre en el hombre es proporcional

a la dosis de LPS. Despues de una inyección i.v. hay un periodo de latencia de 90 a 120 minutos durante el cual se puede sentir frio por la disminución del flujo periférico (Buskirk et al, 1965).

El pico de aumento de temperatura se produce 3-4 horas después de la inyección y la disminución se nota en 7 horas. También se produce un aumento del metabolismo, pues por cada grado de aumento en la temperatura corporal, aumenta el consumo de oxígeno en un 13% (Dinarello y Wolff, 1982).

Desde hace años se sabe que la fiebre producida por el LPS, esta mediada por una sustancia circulante lábil al calor, el pirógeno endógeno (PE) (Atkins Y Wood, 1955, a, b) o pirógeno leucocítico, que es sintetizado por los leucocitos fagocíticos (Berheim et al, 1979). El sistema reticuloendotelial (RES) retiene la mayor parte de LPS después de la inyección i.v.

La velocidad con la que el LPS deja la circulación y entra en el hígado varía del 50% en el primer minuto al 90% después de 5 minutos (Rowley et al, 1956; Braude et al, 1955). Dinarello et al (1968) comprobaron que el LPS activa las celulas Küpffer del hígado para producir PE.

Critz (1981) indica que el PE actua sobre la región hipotalámica del cerebro afectando las neuronas de la regulación de temperatura. El control de la temperatura y la iniciación de la fiebre estan localizadas en el área preóptica del hipotálamo anterior (Berheim et al, 1979). Las microinyecciones de PE en este área producen fiebre, mientras que las inyecciones hechas en el tejido hipotalámico contiguo tienen poco o ningún efecto sobre la temperatura del organismo (Lipton y Kennedy, 1979).

Actualmente se admite que el PE actua en receptores específicos, en el área preoptica del hipotálamo anterior, donde se sintetiza nueva prostaglandina E2 (PGE2) que produce hipertermia (Stitt, 1973). Este mecanismo se ha confirmado por la observación de que antipiréticos como el ibuprofeno (inhibidor de la prostaglandin-sintetasa), reduce los niveles de PGE2 en cortes de hipotálamo anterior y corteza cerebral estimulados por PE (Dinarello y Berheim, 1981).

d. Pirogenicidad y gelificación del LAL

El LAL es un análisis "in vitro" para LPS, al menos unas diez veces más sensible que el análisis de pirógenos en

conejos (Cooper et al, 1971).

Se han analizado con LAL productos de bacterias Gram-positivas y, en general, son de cien a mil veces menos potentes por unidad de peso que el LPS. Preparaciones de peptidoglicano (PG) de diversas bacterias Gram-positivas, extraidos con ácido tricloroacético, han producido análisis LAL positivos en concentraciones 1.000 a 40.000 veces mayores que el LPS (Wildfeuer et al, 1975).

También causan gelificación del LAL, PG obtenidos por hidrólisis con muramidasas pero en concentraciones cien veces mayores que el LPS (Kotani et al, 1977). Las exotoxinas A, B y C de los estreptococos producen LAL positivos en concentraciones que producen fiebre. Si las exotoxinas se calientan a 65°, 30 minutos se destruye la pirogenicidad y la gelificación del LAL, lo cual no ocurre con los LPS que a esta temperatura conserva la pirogenicidad y reactividad con LAL (Brunson y Watson, 1976).

El LAL se ha utilizado para analizar los productos sintéticos análogos a los PG. El más representativo de estos es el muramildipéptido (MDP) que es el N-acetil-L-alanil -D-isoglutamina. Se da buena correlación entre la capacidad pirogénica y la reactividad con LAL del

MDP. La concentración necesaria para producir gelificación es de 100 a 1000 veces mayor que las del LPS de referencia de E. coli (Dinarello et al, 1978; Kotani et al, 1977).

Yin et al (1972) compararon la capacidad para gelificar el LAL del lípido A preparado por hidrólisis ácida (ácido acético 1%) del LPS de Salmonella minnesota, mutante R595, con la capacidad para gelificarlo de los polisacáridos y concluían que es mayor la del lípido A. Tambien observaron que los LPS y el lípido A tratados con álcalis muestran una marcada disminución en su capacidad para inducir la coagulación y puede deberse a la liberación de los ácidos grasos.

La tabla 3 expone la sensibilidad de los análisis LAL y conejos a endotoxinas extraidas de Gram-negativos. Estos datos muestran que el análisis LAL es capaz de detectar endotoxina de un amplio margen de gérmenes Gram-negativos y que el LAL es más sensible a la endotoxina que el análisis sobre conejos.

Jorgensen y Smith (1974) señalaban que el LAL no reacciona con 11 especies de hongos y no puede detectar pirógenos de origen vírico.

Tabla 3. Niveles de endotoxina procedente de gérmenes Gram-negativos detectada por análisis LAL y en conejos.

Bacteria	Cepa	Sensibilidad			
		LAL (+)		Conejo (+)	
		ng/ml	ref	ng/kg	ref
E. coli	0127:B8	2	(49)	5	(49)
		0.03-0.3	(259)	1	(107)
	0111:B4	10	(77)	50	(77)
		0.4-0.5	(127)		
	055:B5	0.06-0.39	(188)	1	(188)
		1	(128)		
		0.1-0.25	(127)		
	026:B6	-		< 1	(116)
Klebsiella pneumoniae	K 67	5	(253)	5	(253)
		> 20	(227)	0.5	(227)
Pseudomonas aeruginosa	P13	1	(128)	-	
Salmonella minnesota	R595	0.5	(190)		
		$5x10^{-7}$	(277)		
	S265	$5x10^{-8}$	(277)		
Salmonella typhi	TY58	1	(227)	0.5	(227)

2. Métodos de análisis "in vivo"

Estos análisis se han realizado en ratas, ratones, pollos, cobayas, conejos, gatos, perros y monos. Weger (1947) observó que inyectando pirógenos bacterianos a hombres, monos, caballos, perros, gatos y conejos, se producía hipertermia. De todos los animales es el conejo el más utilizado como control de rutina en el análisis de pirógenos (Personeus, 1973). El resto no son recomendables por dar respuesta irregular.

a. Valoración en diferentes modelos

- Epinefrina en conejos

Thomas en 1956 demostró que la epinefrina, administrada por via intradérmica, aumenta la acción pirogénica. El método consiste en administrar 100 μg de epinefrina o norepinefrina en la piel abdominal del conejo, inmediatamente antes de la inyección i.v. de la solución pirogénica a analizar. El resultado se da como positivo si aparece hemorragia en el lugar de la inyección de la epinefrina. La sensibilidad del análisis oscila entre 0.1-1 μg de endotoxina. Una desventaja de este método es el número de animales que debe ser empleado.

- Embriones de pollo.

El ensayo se realiza en embriones de pollo de 10 dias, a los que se administra por via i.v. 0.1 mL de solución problema; a continuación se incuban durante 24 horas y se registran como embriones vivos o muertos. El análisis se cuantificó y se relacionó con la capacidad pirogénica en conejos (Milner y Finckelstein, 1966). Marcus y Nelson (1977) indican que su sensibilidad es menor en un 10% que la obtenida utilizando conejos.

Las desventajas de este análisis son: la necesidad de un incubador de humedad y temperatura controlada, y los embriones de pollo de 10 días. Además se requiere práctica de inyección al embrión y son precisas observaciones frecuentes, al menos en intervalos de 8 horas despues de la inyección.

- Ratones y ratas.

Pekarek y Beisel en 1971 observaron que el cinc plasmático disminuía en ratas después de 6 horas de la administración de 0.01-100 μg de endotoxina. Esta respuesta parece estar relacionada con la dosis, y la sensibilidad es suficiente.

Boobis y Hartley (1981) propusieron este método como análisis de pirógenos utilizando ratones. Una dosis de endotoxina de 50 pg puede producir una disminución detectable en la concentración de cinc plasmático. Observaron una disminución máxima del 60% después de 4 horas de la inyección de endotoxina de Salmonella abortus equi, Shigella dysenteriae o Escherichia coli. Además la relación entre la disminución del cinc y el logaritmo de la dosis de endotoxina era lineal, aunque la respuesta a la endotoxina de S. dysenteriae era menor.

Tambien encontraron disminución de cinc despues de inyectar productos procedentes de bacterias Gram-positivas (Staphylococcus albus); el test LAL cualitativo daba sin embargo negativo.

Las ventajas indicadas para este método es que se pueden analizar pirógenos procedentes de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que tiene sensibilidad similar al análisis LAL y mayor que el método en conejos.

Sveen et al (1977) estudiaron la letalidad para ratones y embriones de pollo, la capacidad pirogénica en conejos y la capacidad para gelificar el LAL de los LPS de los

gérmenes anaerobios Bacteroides, Fusobacterium y Veillonella. Utilizaron como endotoxina de referencia el LPS de Salmonella enteritidis cepa S-795 extraido con fenol-agua al 45%. El LPS de Bacteroides presentó baja actividad por los cuatro métodos de análisis. Todos los LPS estudiados presentaron buena correlación entre los cuatro métodos, lo cual parecía indicar que tienen en común un componente endotóxico capaz de iniciar todas las actividades biológicas analizadas. La dosis de LPS de Veillonella y Fusobacterium requerida para dar un análisis LAL positivo, fue 1/100 a 1/1000 de la requerida para dar respuesta en conejos.

b. Valoración en conejos

El procedimiento de análisis en conejos tal como aparece en la USP XXI (1985) es básicamente el mismo que aparecía en la USP XII en 1942: inyección i.v. de la solución a analizar y el registro de las temperaturas rectales de los conejos.

- Variables en el análisis

Raza. La elección de la raza de los conejos es fundamental para un análisis en conejos con éxito. La raza Dutch Belt muestra una gran resistencia a las

enfermedades intestinales, es un conejo pequeño y no gana peso rapidamente. Tiene las desventajas de poseer piel pigmentada y orejas relativamente pequeñas las cuales hacen que la inyección intravenosa sea más dificil, presenta una incidencia anormalmente elevada de hipotermia cuando se coloca bajo luz restringida con aparatos de medida de temperatura eléctricos. Este fenómeno es mucho menos notorio cuando se utilizan termómetros normales en esta raza (Grant, 1950).

El conejo chinchilla presenta piel pigmentada pero sus grandes orejas lo hacen ventajoso para inyecciones intravenosas repetidas. Su mayor desventaja es que gana peso rápidamente y por tanto es más incómodo de manejar y precisa mayores volúmenes de muestra.

El conejo más ampliamente utilizado en análisis de pirógenos es el de raza albina que incluye los conejos blancos de Nueva Zelanda y Bélgica. Ambas razas se adaptan de forma rápida al análisis. El blanco de Bélgica se encuentra en Europa y Canadá. Tiene la ventaja de poseer un cuerpo más pequeño y orejas mayores que el de Nueva Zelanda. Este último, sin embargo, es el más ampliamente criado y utilizado en Estados Unidos. Es fácilmente

manejable y entrenable para el análisis de pirógenos. Es propenso a las infecciones intestinales y respiratorias y esto implica un correcto mantenimiento de los animales para prevenir infecciones generalizadas en la colonia (Personeus, 1973).

Peso. Las normativas de las farmacopeas (tabla 4) para análisis de pirógenos, establecen un peso mínimo de 1500 g. Personeus (1973) opinaba que parece más adecuado un peso de 1700 a 1800 g como mínimo, pues generalmente mantienen mejor la salud frente al cambio, que los animales más ligeros.

Sexo y edad. Lipton y Ticknor (1979) estudiaron la influencia del sexo y la edad sobre las respuestas febriles a la administración i.v. de pirógeno leucocítico en el conejo: en el caso de los conejos machos, los de 2 años desarrollaron fiebres proporcionales a la dosis de pirógeno, mientras que los de 2-3 años mostraron grandes reacciones febriles no relacionadas con la dosis. Los conejos hembra de 2 y 3 años sufrieron pequeños incrementos de temperatura y los de 3-5 años solo desarrollaron fiebre despues de dosis altas.

Número de conejos. El número requerido para mantener un

programa diario de análisis de pirógenos se estima teniendo en cuenta los siguientes puntos: Número de muestras que se analizan a diario. Cuatro conejos por muestra por día para compensar los animales anulados Utilizar un número de animales doble del factor calculado en los dos primeros puntos, lo que permite la reutilización de los conejos cada 48 horas.

Mantenimiento. Los stress ambientales, debidos a cambios en su lugar de estancia, dieta o traslado, inducen enfermedades que producen desgaste en los nuevos conejos que se reciben. Una infección puede comprometer a una colonia completa si no se toman medidas de cuarentena y vigilancia de rutina durante al menos una o dos semanas después de recibir una expedición. Si los animales no son supervisados por un veterinario es esencial tener un manual de instrucciones sobre cuidado y mantenimiento de los conejos (Personeus, 1973).

Se observará la variación diurna de temperatura que debe quedar en un margen de 0.3°. Pueden permitirse variaciones día a día de 0.2° respecto a la temperatura media.

Los animales cuya historia incluya materiales antigénicos o proteínicos: sueros, fracciones globulínicas,

antitoxinas etc, no serán utilizados en 3-5 dias. La reutilización indiscriminada puede producir resultados variables (Personeus, 1969).

El grado de restricción en el movimiento de los conejos puede causar mayores diferencias en la sensibilidad y frecuentes faltas de correlación en los resultados. En general se aconseja restricción ligera del movimiento del cuello del conejo (Dare, 1953).

Análisis previo. Los conejos deben ser colocados en el lugar de análisis como mínimo una semana antes de utilizarlos. En la práctica muchos laboratorios utilizan de 2 a 6 semanas en su programa de entrenamiento para nuevos animales. La mayoría de las farmacopeas (ver tabla 5) requieren al menos un análisis de muestreo antes de utilizar un animal para analizar un producto.

Marcus y Nelson (1977) señalaban que tiene gran importancia la selección inicial con una muestra apirógena en los nuevos conejos que se incorporan a la colonia, ya que una parte de los mismos muestra una temperatura errática.

Hay diferencias de opinión sobre la indicación de hacer

una selección con un extracto pirogénico. Parece que la selección con un pirógeno estandar puede reducir la sensibilidad de los conejos; aparte del factor económico por los prolongados tiempos de espera. Puede ocurrir que un conejo sometido a un periodo de descanso de 15 días o más, muestre un esquema de temperatura basal errático. Se atribuye a un "olvido" de su periodo de entrenamiento previo y en general un test de muestreo es suficiente para reentrenar a estos animales.

Laboratorio y equipo. Los aspectos físicos del lugar donde van a ser realizados los análisis varían considerablemente según la amplitud del programa. No se recomienda realizarlo en la misma habitación donde viven los conejos. Es esencial que los conejos estén sometidos a las mínimas molestias mientras se realice el análisis.

El conejo es un animal que posee mecanismos termoreguladores ineficaces y en la estancia donde vivan se mantendran las características ambientales dentro de unos márgenes; la temperatura oscilará entre 21-23 $^{\circ}$ (May y Wiseman, 1972). Los conejos deben ser mantenidos en cajas individuales.

Termómetros. Se utilizan termómetros rectales simples o

eléctricos calibrados, frente a uno certificado, que se insertan en el recto unos 5 cm. El tipo de termómetro puede influenciar la sensibilidad del análisis (Dare, 1953).

Registro. Es conveniente registrar para cada remesa de animales datos como: procedencia, sexo y peso. Es necesaria una ficha de registro individual para cada animal en la que se registrará la temperatura basal, el test de prueba, los aumentos de temperatura para las muestras analizadas, peso, mL inyectados por kg, y notas como las pérdidas en animales por disminución de peso, enfermedad o fallo en reunir los estandares de entrenamiento. Si se utilizan aparatos electrónicos que incluyan fichas de registro de temperatura, estas fichas pueden servir de registro permanente (Personeus, 1973).

- Sensibilidad del análisis en conejos

Marcus y Nelson (1977) determinaron la sensibilidad de los conejos a la endotoxina observando que estaba comprendida entre 1-10 ng/kg de peso. Es decir un conejo seguro de 3 kg deberá responder con incremento de temperatura de 0.6° o más sobre la temperatura basal después de 3 horas de la inyección de 1-10 ng/kg.

Personeus (1973) indicaba que algunos medicamentos tales como clorpromazina y derivados de la fenotiazina, algunos hipnóticos, anestésicos (procaina) y antipiréticos pueden ser problemáticos sino imposibles de valorar a causa de su efecto hipotérmico enmascarante. La dilución requerida para neutralizar esta interferencia con la respuesta normal del conejo, puede ser tan grande como para hacer este análisis impracticable.

- Tolerancia

Kanoh et al (1977) estudiaron el desarrollo de tolerancia a pirógenos en conejos tratados con dosis diferentes de lipopolisacárido (LPS) de E. coli obteniendo los siguientes resultados:

El desarrollo de la tolerancia pareció producirse en dos etapas: en la primera la tolerancia apareció rápidamente y en la segunda, la tolerancia se produjo más gradualmente en respuesta a inyecciones repetidas de una dosis constante. El segundo tipo de tolerancia no fué absoluto; los conejos fueron aún sensibles a dosis incrementadas de LPS. Los conejos inmunizados con el LPS de E.coli perdieron su sensibilidad pirogénica en cierto grado a los

LPS parenterales.

Bangham (1979) indica que a pesar de que el análisis en conejos se ha mostrado seguro durante más de 30 años, no ha sido estandarizado por algunas razones: Los resultados dependen de la sensibilidad absoluta de los animales a las moléculas específicas del pirógeno. En casos límite, un resultado puede no ser reproducible. Los pirógenos pueden estar irregularmente distribuidos en los envases. El producto pirogénico es muy variable: endotoxinas varias, LPS, LPS degradado u otros fragmentos bacterianos.

Otra causa de la respuesta irregular de los conejos es que pueden desarrollar inmunidad parcial a las endotoxinas. Como mostró el estudio en colaboración de la OMS en 1959 la respuesta de los conejos a los pirógenos puede ser inconstante y facilmente influenciable por el stress u otras causas, variando entre laboratorios y la curva dosis-respuesta fué a veces errática y no útil.

- Normativa

Desde 1952, el Comité para la revisión de la USP, así como el Comité de Expertos para análisis biológicos de la OMS han intentado mejorar la estandarización del análisis

de pirógenos. El interés se centró al principio en el desarrollo del análisis comparando muestras de un pirógeno estandar. Sin embargo la posibilidad de desarrollo de tolerancia en los conejos ha sido un factor excluyente importante para su aceptación como procedimiento estandar.

En 1941 el Comité de revisión de la USP inició el primer estudio en colaboración de análisis de pirógenos en conejos, en 16 laboratorios y durante nueve semanas, con 1782 inyecciones de un extracto pirogénico de Pseudomonas aeruginosa. Como consecuencia de los resultados del estudio solo se permitía la reutilización de los conejos despues de un análisis positivo, tras un intervalo de descanso de dos días. Actualmente USP XXI (1985) requiere un periodo de al menos dos semanas.

El Comité de Expertos de Estandarización de Preparados Biológicos de la OMS, en 1952, dió dos preparaciones pirogénicas de referencia para estudios en conejos, con objeto de estudiar su capacidad como estandar y determinar la sensibilidad de los conejos utilizados. Las preparaciones pirogénicas fueron un extracto de Proteus vulgaris y un polisacárido de Serratia marcescens, participando en el proyecto catorce laboratorios. Los

resultados mostraron una amplia variación en la respuesta pirogénica en todos los niveles de dosis. La sensibilidad de los conejos variaba de unos laboratorios a otros significativamente.

En 1959 los resultados variables decidieron la preparación de otro estandar de referencia (Davies et al, 1954). Este, recomendado por el Comité de Estandarización Biológica, era el antígeno "O" somático de Shigella dysenteriae, cepa K-624. Estudios adicionales que se emprendieron dieron como resultado un nuevo extracto que fué elegido por la OMS como preparación pirogénica de referencia internacional y hoy todavía continua vigente. Se presenta en ampollas de 2 mg de antígeno "O" somático de Shigella dysenteriae (OMS, 1984, p 66).

Varney (1962) describe los resultados parciales de otro estudio en colaboración, con cinco preparaciones pirogénicas en 1500 conejos, observando variaciones en la sensibilidad de las distintas colonias de animales y posible tolerancia inducida por inyecciones repetidas de las mismas.

Weiss (1978) comunicó el aislamiento de lipopolisacáridos de diferentes gérmenes Gram-negativos e indicaba que debido al origen heterogéneo de los pirógenos , no ha podido establecerse un pirógeno estandar reproducible en los análisis biológicos.

Puede ser útil una comparación de diferentes textos oficiales sobre el análisis de pirógenos en conejos (tablas 4, 5, 6, 7).

Valoración de los resultados según las diferentes farmacopeas

Ph. I. III (1980)

Considerar cualquier temperatura negativa como aumento 0. Si ningún conejo muestra un incremento de temperatura de 0.6 ° o más sobre su respectiva temperatura control y si la suma de los tres incrementos de temperatura no excede de 1.4 ° , el producto reune los requerimientos de ausencia de pirógenos.

Si cualquier conejo muestra un aumento de temperatura individual de 0.6 ° o más o si la suma de los tres incrementos de temperatura individuales excede de 1.4 °, continuar el análisis utilizando otros 5 conejos. Si no

Tabla 4. Pirógenos en conejo, datos de farmacopeas: peso, fijación y alimento.

	Conejo		
Farmacopea	Peso (Kg)	Fijación	Alimento
Ph. I. III (1980)	-	-	Privación 2 h antes y durante el análisis
Ph. Eur. II (1980)	Mínimo 1.5	Cuello, en posición normal de asiento	Privación la la noche anterior al análisis
USP XXI (1985)	-	Ligera en cuello	Privación durante el análisis
BP (1980)	(a)	(a)	(a)
Ph. Hung. (1970)	(a)	Cuello	Privación las 12 h anteriores al análisis
2.AB-DDR (1975)	1.5-3.5	-	Privación las 12 h anteriores.
DAB 8 (1978)	Mayor de 1.5 Kg	-	Privación el día del análisis

Ph. I., Pharmacopoea Internationalis; Ph. Eur., Pharmacopée Européenne; USP, United States Pharmacopoeia; BP, British Pharmacopoeia; Ph. Hung., Pharmacopoea Hungarica; AB-DDR, Arzneibuch der Deutschen Democratischen Republik; DAB, Deutsches Arzneibuch.

(a) igual que normativa Ph. Eur.

Tabla 5: Pirógenos en conejo, datos de farmacopeas: agua, termómetro y análisis previo.

	Conejo		
Farmacopea	Agua	Profundidad termómetro (cm)	Criba inicial o o análisis previo
Ph. I. III (1980)	Permitido acceso	6	1-3 dias antes, entrenamiento omitiendo inyección
Ph. Eur. II (1980)	Privación durante el análisis	5	Cloruro sódico 0.9% apirógeno 10 mL/kg 1-3 días antes
USP XXI (1985)	Permitida puede restringirse durante el análisis	7.5 mínimo	Hacerlo menos de 7 días antes de usar el conejo
BP (1980)	(a)	(a)	(a)
Ph. Hung. (1970)	Privación 12 h antes del test	6-8	-
2.AB-DDR (1975)	Privación 12 h antes del test.	6	Excluir si cloruro sódico 0.9% produce aumentos de Ta>0.4 C
DAB 8 (1978)	-	6	Cloruro sódico 0.9% 10 mL/kg, 3 dias antes y prueba + de sensibilidad

Tabla 6. Pirógenos en conejo, datos de farmacopeas: temperatura control, tiempo de determinación y registro.

	Conejo		
Farmacopea	Temperatura control° C	Tiempo determinación	Registro del test
Ph. I. III (1980)	(a)	Registrar 2 temperaturas 40 minutos antes de la inyección cada 30 min.	Continuo o cada 30 min durante 3 horas
Ph. Eur. II (1980)	Excluir conejos con temp. inicial > de 39.8 o < de 38	Registrar durante 90 minutos antes de la inyección cada 30 minutos. Usar la media de 2 valores determinados con intervalos de 30 minutos.	Cada 30 minutos durante 3 horas.
USP XXI (1985)	Excluir conejos con temp. inicial > de 39.8	Periodo de tiempo demostrado previamente como suficiente.	1,2 y 3 horas despues de la inyección
BP (1980)	(a)	(a)	(a)
Ph. Hung. (1970)	Utilizar solo conejos con temperatura inicial = 38.5-39.8	Es la media de las temperaturas registradas 1-3 dias antes del análisis 4 veces/día a intervalos de 1 h	-
2.AB-DDR (1975)	Excluir si temperatura es < de 38.9 o > de 39.8	Dos veces con intervalo de 30 minutos.	IV: 4 veces cada 30 min IM: 5 veces cada 60 min
DAB 8 (1978)	Excluir si temperatura es < de 38.5 o > de 39.7	Medirla 1-3 dias antes de 8-16 horas cada 2 horas	6 veces cada 45 min o comprobar temp. 4.5 h

Tabla 7. Pirógenos en conejo, datos de farmacopeas: reutilización, volumen de muestra y temperatura.

	Conejo	Muestra	
Farmacopea	1. Reutilización 2. Pirógenos +	Volumen	Temperatura °C
Ph.I. III (1980)	1. 48 horas 2. Descansar 2 semanas o si ha sufrido aumentos de temperatura de 0.6° o más	10 mL/Kg o monografía Maxima duración inyección 4 min.	38
Ph. Eur. II (1980)	1. 72 horas 2. Descansar 3 semanas o si el aumento medio de temperatura excede 1.2°	Segun monografía. > de 0.5 mL/Kg < de 10 mL/Kg Máxima duración inyección 4 min.	38.5 aprox
USP XXI (1985)	1. 48 horas 2. Descansar 2 semanas si ha sufrido incrementos de 0.6° o mas.	10 mL/Kg Máxima duración inyección 10 minutos.	37± 0.2
BP (1980)	(a)	(a)	(a)
Ph. Hung. (1970)	1. 48 horas 2. Descansar 2 semanas	-Preparaciones toleradas: 10 ml/kg -Otras: monografía	37
2.AB-DDR (1975)	1. 72 horas 2. Descansar 14 días	10 mL/kg	20-40
DAB 8 (1978)	1. 72 horas 2. Descansar 3 semanas	-Pequeño vol: 1/10 de la dosis terapéutica habitual. -Perfusiones: 25 mL por Kg (max. 50 mL)	20-38

más de 3 de los 8 conejos muestran incrementos de temperatura de 0.6° o más y si la suma de los 8 incrementos de temperatura individuales, no excede 3.7°, las muestras reunen los requerimientos para ausencia de pirógenos.

Ph. Eur. II (1980)

No. conejos	Pirógenos negativo si la suma de los aumentos es < de: (°C)	Pirógenos positivo si la suma de los aumentos es > de: (°C)
3	1.15	2.65
6	2.80	4.30
9	4.45	5.95
12	6.60	6.60

Si la suma de los incrementos de temperatura está entre las dos columnas, se repite el análisis con grupos de 3 conejos hasta un total de 4 grupos.

USP XXI (1985)

Valoración de resultados igual que la Ph. I.

B.P. (1980)

Valoración de resultados igual que Ph. Eur.

Ph. Hung. (1970)

Pirógenos negativo		
No. de conejos	No. de conejos con incremento de temperatura menor de 0.6°	Suma de los aumentos de temperatura de los conejos menor de:
3	0	1.2
6	1	2.8
9	3	4.4
Pirógenos positivo		
No. de conejos	No. de conejos con incremento de temperatura mayor de 0.6°	Suma de los aumentos de temperatura de los conejos mayor de:
3	1	2.6
6	4	4.4
9	4	4.4

DAB 8 (1978)

Si la suma de los cuadrados de los incrementos de temperatura sobre 3 conejos es menor de 0.6, la muestra se considera apirógena. Si esta suma es igual o mayor de 0.6 es preciso ampliar el análisis sobre 5 conejos más y si la suma de los cuadrados de los 8 incrementos de temperatura es menor de 1.6, la muestra se considera apirógena. Si es mayor de 1.6 no cumple los requerimientos.

2.AB-DDR (1975)

Se realiza un primer análisis sobre 3 conejos y llamando A a la suma de los cuadrados de los incrementos de temperatura se indican los resultados en la tabla siguiente. Si el valor de A está entre los dos límites se realiza una primera repetición sobre 3 conejos y si ocurre lo mismo se realiza una segunda repetición sobre 6 conejos más.

	Pirógenos negativo si A < de: (°C)	Pirógenos positivo si A > de: (°C)
Análisis	0.47	1.40
Primera repetición	1.10	1.60
Segunda repetición	1.70	1.70

3. Métodos "in vitro"

a. Agregación plaquetaria

Los pirógenos y endotoxinas ejercen una acción directa sobre las plaquetas y las células sanguíneas, produciendo agregación en las plaquetas y aumento de la fragilidad osmótica y fenomenos quimiotácticos en los leucocitos con liberación de pirógeno endógeno (Dony, 1979).

Este método permite detectar pirógenos utilizando técnicas de agregación plaquetaria, en agregómetro para sangre total y en lumiagregómetro para plasma rico en plaquetas (PRP).

De Gaetano (1982) señala que la plaqueta estimulada por la endotoxina activa el factor X de la coagulación. La activación de la plaqueta es mediada a través de los leucocitos. En la púrpura trombocitopénica trombótica y en el sindrome urémico hemolítico se ha señalado como mecanismo etiopatogénico que la endotoxina activa la agregación plaquetaria y produce deposición de fibrina y anemia hemolítica.

Ventajas. El método permite analizar un compuesto pirogénico con células humanas, lo que presupone poder detectar más específicamente cualquier tipo de

desencadenante pirogénico.

b. Análisis microbiológico

El análisis microbiológico es de gran utilidad para detectar posibles fuentes de contaminación antes de la fabricación, durante el proceso y en el producto terminado. Marcus en 1964 describió una sencilla técnica para recuentos de bacterias en soluciones parenterales antes de su esterilización, utilizando filtros de membrana y medios de cultivo apropiados. Los datos obtenidos los relacionaba con la hipertermia producida en conejos despues de haber sido esterilizados. Observó que las sustancias pirogénicas más potentes procedían de bacterias Gram-negativas y algunas Gram-positivas.

El recuento lo realizó de la forma siguiente: las soluciones parenterales que contenían bacterias vivas se dividieron en dos partes. Una parte se pasaba por filtros de membrana de 0.22 μm cultivando posteriormente estos filtros en varios medios a temperatura ambiente y a 37°. De esta manera se conocía el numero de bacterias, hongos y levaduras viables presentes en la solución. El resto de la solución se esterilizaba a 120°, 15 minutos y se administró a conejos en dosis de 10 mL/kg. Los resultados obtenidos indicaban que

cuando la solución contenía menos de 100 microorganismos por mL el resultado en conejos era negativo, ocurriendo lo contrario cuando el número de gérmenes era de 1.000 ó más gérmenes por mL.

Este método de recuento microbiológico descrito fue utilizado por Greppin y Nguyen (1973) para estudiar la calidad microbiológica del material de vidrio, acero, agua para inyectables, filtros y productos antes de la esterilización. En Farmacia de Hospital, para fabricación de preparados parenterales de gran volumen, relacionaba los pirógenos con su origen bacteriano.

Personeus en 1973 señalaba como una limitación del método, el que no pueda detectar residuos bacterianos no viables. Otra desventaja observada es que el tiempo requerido para determinar los resultados es demasiado largo.

c. Lisado de amebocitos de Limulus

- Generalidades

El origen de este método de análisis de pirógenos se remonta a los comienzos del siglo XX. Loeb en 1902 y posteriormente Alsberg y Clarck en 1908 observaron que se producían fenómenos de coagulación en la hemolinfa de un

invertebrado marino denominado Limulus polyphemus que aparece de forma abundante en las aguas litorales atlánticas americanas. Se le conoce vulgarmente como "cangrejo en herradura de caballo", debido a la forma que presenta su escudo promosómico o "cangrejo con cola de flecha" por la forma de su metasoma. Es un quelicerado perteneciente a la clase de los Merostomas, subclase Xifosuros, orden xifosurídos (Arístegui, 1978).

En presencia de endotoxinas procedentes sobre todo de bacterias Gram-negativas se produce la coagulación de los líquidos circulantes del cangrejo. La hemolinfa contiene amebocitos y se ha observado que obteniendo un lisado de los mismos y añadiendo "in vitro" una cantidad de diferentes endotoxinas, del orden de ng/mL, aparecía un gel (Fusellier et al, 1977).

Como fuentes de lisado de amebocitos se han ensayado otras especies. Pearson et al en 1973 utilizaron el lisado de Maia squinado para valorar una endotoxina de E. coli. Observaron que los resultados eran positivos para concentraciones altas de endotoxina; lo mismo le ocurrió a Klein et al en 1974 con los lisados obtenidos de Tachypleus gigas y Carcinosporus rotundicauda. Kimura en

1976 comparó el lisado obtenido de Tachypleus tridentatus con el de Limulus polyphemus y encontró que su sensibilidad era diez veces menor.

El análisis con el lisado de amebocitos de Limulus polyphemus (LAL) se realiza mezclando asépticamente un volumen de muestra a analizar con el lisado e incubando a 37° durante un tiempo. Puede realizarse de forma cualitativa o semicuantitativa valorando la formación de gel (la técnica mas extendida) y cuantitativamente por colorimetría. El macrométodo utiliza 0.1 mL de solución de reactivo y 0.1 mL de la solución a analizar. El micrométodo es empleado sobre lámina de vidrio o en tubo capilar con volúmenes de reactivo y de solución a analizar que corresponden a 0.01 mL solamente (Fusselier et al, 1983).

Estos autores explicaban el sistema enzimático por el que se produce la gelificación. Entran en reacción los elementos siguientes:

- Proenzima (PE) M= 150.000
- Enzima de gelificación M=21.000
- Cationes bivalentes
- Enzima activado (EA)

- Coagulógeno

La secuencia de reacción sería la siguiente:

a) PE + Ca + Endotoxina = EA

b) EA + Coagulógeno = Gel
----->
Hidrólisis

El gel esta formado por cadenas polipeptídicas de gelificación. La hidrólisis del coagulógeno por EA se realiza a nivel de la arginina en la secuencia de aminoácidos. Esta reacción puede ser utilizada para la dosificación colorimétrica de las endotoxinas. Se han propuesto substratos sintéticos cromógenos con la cadena peptídica Ac-Ile-Glu-Gli-Arg unido a la nitroanilina.

La potencia del LAL se puede calibrar utilizando una endotoxina estandar y/o una preparación de referencia de lisado (Hochstein et al, 1973).

En algunos casos se han observado variaciones de la potencia del lisado. Estas variaciones fueron detectadas por Jorgensen y Smith (1973), Sullivan y Watson (1974), Wachtel y Tsujii (1977) y Marcus y Nelson (1977). Estos últimos estandarizaron el lisado mezclando porciones de lotes con diferentes sensibilidades y obtuvieron un nivel

de sensibilidad conocida.

Yin et al en 1972 comprobaron la mayor sensibilidad del LAL detectando niveles de endotoxina del orden de pg/mL; esta mejora la atribuyeron a la rotura mecánica de los amebocitos y también al empleo de un regulador que contenía cloruro cálcico, permitiendo de este modo que la reacción entre la endotoxina y la proteina coagulable procedente de los amebocitos tuviera lugar a un pH óptimo.

Fusselier et al (1983) indicaban que la sensibilidad de los lisados de amebocitos para la detección de endotoxina E. coli 055:B5 esta comprendida entre 10 y 100 pg/mL.

Endotoxina de referencia.

El grado de gelificación es proporcional a la concentración de endotoxina y a su potencia pirogénica. Esta proporcionalidad se establece mediante patrones. En este aspecto son interesantes los estudios realizados por Weary et al en 1980. Estos autores estudiaron de forma comparativa cuatro endotoxinas estandar, valorando su capacidad pirogénica por los métodos de LAL y conejos. Las endotoxinas analizadas fueron las siguientes:

- Escherichia coli 0113:H10:KO: preparación extraida por

fenol y denominada EC-2 por el Bureau of Biologics (Bu Bio) de la FDA como estandar de referencia nacional.

- Escherichia coli 055:B5: preparación extraida con ácido tricloracético y seleccionada como estandar de referencia para establecer la relación entre LAL y conejos por la Health Industry Manufacturers Association.

- Endotoxina de Shigella dysenteriae: estandar de referencia designado por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

- Salmonella abortus equi: preparación extraida con fenol y denominada Novo-pyrexal.

De los resultados obtenidos parecen ser el Novo-pyrexal y E. coli 055:B5 las endotoxinas de referencia más potentes. En general el análisis LAL es más sensible a las endotoxinas que el análisis sobre conejos (Graham, 1978).

La USP-XXI (1985) señala un margen entre 2 y 50 UE/ng para la potencia de las endotoxinas control.

Dressel en 1976 investigó la sensibilidad del análisis LAL para el nucleinato sódico, pirógeno estandar de la farmacopea de la República Democrática Alemana, primera edición. Observó que la sensibilidad del análisis LAL al

nucleinato sódico es muy similar a la de los lipopolisacáridos bacterianos. Sus resultados al igual que los de Tonnesen (1975) indicaban que dosis bajas de nucleinato producen una mejor gelificación que dosis muy elevadas.

- Interferencias

Cualquier sustancia que pueda desnaturalizar las proteinas o inhibir una reacción enzimática, deberá ser estudiada de forma particular para ser valorado su nivel de endotoxina por LAL; debido a que la reacción de gelificación es mediada por un enzima tipo tripsina, lábil al calor y sensible al pH (Cooper y Pearson, 1977).

Esto se determina comparando la reactividad del lisado con una endotoxina en presencia y ausencia de la sustancia a analizar; asi como frente a la formulación completa, ya que también otros componentes que no sean los principios activos pueden modificar la gelificación (Van Noordwijk y De Jong, 1977).

En muchos casos la interferencia de la gelificación puede ser evitada ajustando el pH de la preparación dentro de los niveles de pH óptimo para el lisado, que oscilan entre

6 y 8 (Murata et al, 1976) o bien, diluyendo la muestra (Mc Cullough y Scolnick, 1976). Las muestras viscosas deberán mezclarse bien para ser analizadas (Daoust et al, 1976).

En la tabla 8 se indican algunas sustancias que se han mostrado compatibles con la reacción LAL y en la tabla 9 las que se han mostrado incompatibles.

Van Noordwijk (1979) señalaba que los inhibidores enzimáticos, los agentes desnaturalizantes de proteinas, suero o plasma y pH menor de 5 o mayor de 9, pueden causar reacciones negativas que hacen el análisis no válido debido a la inhibición. Observó que diluyendo las muestras en distinta proporción para cada sustancia evitaba la ihibición, aunque no en todos los casos.

Fussellier et al (1977) investigaron la influencia de la multiplicidad de iones sobre el análisis LAL, observando que no la modificaba. Los productos que contienen concentraciones importantes en glucoheptonato de calcio o gluconato de calcio, precisan ser diluidos para evitar gelificación que perturbe la reacción.

Tabla 8. Sustancias compatibles con la reacción LAL

Sustancia	Dilucion	Referencia
Agua destilada	-	Fumarola et al, 1975
Bicarbonato sódico 4.2%	1/5	"
Bicarbonato sódico 8.4%	1/10	"
Bicarbonato sódico 1.4%	1/2	"
Cloruro cálcico 21.9%	1/20	"
Cloruro sódico 0.9%	-	"
Cloruro potásico 10%	1/10	Fusselier et al, 1977
Cloruro sódico 20%	1/10	"
Cloruro cálcico 1%	-	"
Cloruro magnésico 10%	1/5	"
Cloruro potásico 0.75%	-	"
Dopamina 1%	-	"
Dextrano 40 al 10%	-	Fumarola et al, 1975
Dopamina 5%	-	Fusselier et al, 1977
Gluconato cálcico 10%	1/10	"
Glucosa 66%	1/10	"
Glucosa 5 y 10%	-	Fumarola et al, 1975
Glucosa 50%	1/10	Fusselier et al, 1977
Glucosa 20%	1/2	"
Glucosa 30%	1/6	"
Ioduro sódico 1%	-	"
Ioduro sódico 5%	1/5	"
Manitol 10%	1/2	"
Procaina 1%	-	"
Polivinilpirrolidona 3.5	1/10	"
Sorbitol 5%	-	"
Sulfato magnésico 33%	1/10	"
Sulfato magnésico 15%	1/6	"
Salicilato sódico 10%	1/10	"
Xilitol 5%	-	Fumarola et al, 1975

Tabla 9. Sustancias que modifican la reacción de gelificación

Sustancias inhibidoras	Referencia
Alcohol bencílico > 0.1%	Cooper y Pearson (1977)
	Merlin (1979)
Acetilcisteina	Van Noordwijk (1979)
Acido ascórbico	Guilfoyle y Munson (1982)
Ampicilina	Van Noordwijk y Kruger (1983)
Bacitracina	"
Bisulfito sódico	Guilfoyle y Munson (1982)
Cloranfenicol	Kruger et al (1976)
	Van Noordwijk (1979)
Clorhidrato de Tetraciclina	Van Noordwijk y De Jong (1977)
Citratos	Fussellier et al (1977)
Cisteina	Kobayashi et al, 1975
Carbozocromo salicilato	Guilfoyle y Munson (1982)
Ciclicina lactato	"
Emulsiones grasas	Van Noordwijk (1979)
EDTA	Guilfoyle y Munson (1982)
Edetato disódico	"
Estreptomicina	Van Noordwijk y Kruger (1983)
Fenol	Guilfoyle y Munson (1982)
Fluoresceina sódica	"
Glutation	Van Noordwijk (1979)
Heparina	Guilfoyle y Munson (1982)
I-131 bromosulfaleina	Murata (1976)
I-131 rosa de bengala	Guilfoyle y Munson (1982)
Ketamina	"
Oxacilina sódica	"
Penicilina procaina	Van Noordwijk y Kruger (1983)
Prometazina	Guilfoyle y Munson (1982)
Polimixina B	Van Noordwijk y Kruger (1983)
Sulfisoxazol diolamina	Guilfoyle y Munson (1982)
Sulfobromoftaleina	"
Soluciones A.C.D.	Fussellier et al (1977)
Soluciones C.P.D.	"
Tiroxina	"
Zn-69m acetato de cinc	Mc Auley et al (1974)

Tabla 9 (continuación)

Sustancias parcialmente inhibidoras	Referencia
Lactosa 25%	Van Noordwijk y Kruger (1983)
Metilparaben	"
Propilparaben	"
Ringer lactado en glucosa 5%	"
Sustancias promotoras	
Gelatina	Cooper y Harbert (1975)
Tripsina	Solum (1973)
Trombina	Elin y Wolff (1973)
Tromboplastina	Kimura (1976)

Guilfoyle y Munson de la FDA en 1982 definían la máxima dilucion válida (MDV) para ser analizada. La MDV se calcula en dos etapas:

1) Mínima concentración valida (MCV):

$$MCV = \frac{S\ M}{K}$$ donde:

S = Sensibilidad del reactivo LAL en unidades de endotoxina por ml (EU/ml)

M = Dosis sobre conejo o maxima dosis humana/kg, la que sea mayor.

K = Limite de tolerancia, 5 EU/kg (1 ng/kg)

2) Máxima dilución valida (MDV):

$$MDV = \frac{\text{Concentracion del producto}}{MDV}$$

$$MDV = \frac{\text{C (conc. producto) x 5 EU/kg (limite)}}{\text{S (sens. reactivo) x M (dosis max/kg)}}$$

El producto se diluirá una parte a MDV partes con agua o cloruro sódico 0.9% del reactivo LAL.

Otra forma de suprimir la inhibición es la ultrafiltración que puede aplicarse cuando la sustancia inhibidora tiene una masa molecular muy inferior a la de las endotoxinas.

Estas son retenidas sobre filtros moleculares cuyo limite nominal de separación esta comprendido entre 10.000 y 20.000. Después se redisuelven en un disolvente adecuado y la solución así obtenida, se somete al análisis LAL (Maignan, 1978; Van Noordwijk y Kruger, 1983).

- Aplicaciones del método LAL.

Desde la aparición del método LAL se han ido investigando diferentes aplicaciones que se exponen a continuación:

Agua para inyección.

El LAL permite verificar antes de su utilización, el agua para inyección en la preparación de soluciones parenterales, asi como durante el proceso de fabricación (Rinjard, 1979).

Materias primas.

En 1977 Fusselier et al analizaron por LAL diferentes materias primas (disueltas en agua para inyección): cloruro sódico, glucosa, glicerol, bicarbonato sódico, etc. y concluían que el control de calidad es más severo y permite obtener materias primas más limpias.

Fluidos i.v. de gran volumen.

Mascoli y Weary (1979) observaron en un gran número de lotes de fluidos i.v. concordancia entre los métodos de LAL y conejos. Del total de lotes, 37 habían sido positivos por LAL y de estos solo 4 habían dado resultado positivo en conejos, lo cual confirma la mayor sensibilidad del LAL para estos productos. Fumarola et al en 1975 controlaron fluidos i.v. de gran volumen fabricados en farmacia de hospital confirmando el análisis LAL para solución de cloruro sódico al 0.9%, dextrano al 10% y al 40%, xilitol 5%, manitol 20%, glucosa 5% y 10%, lactato sódico y bicarbonato sódico.

Robino y Zaccaria (1976) utilizaron el LAL con resultados satisfactorios para soluciones de glucosa al 5, 10, 20, 40, 50 y 70%, soluciones electrolíticas, levulosa 5, 10 y 20% y glicerol al 20%. Fusselier (1979) señalaba que también podía ser de interés este análisis para controlar los fluidos i.v. de gran volumen a los que se adicionaba medicamentos en farmacia de hospital.

Inyectables de pequeño volumen.

Fusselier et al (1977) analizaron por LAL 287 lotes de inyectables de volumen menor de 15 mL y de ellos 283

fueron negativos y 4 positivos. En un estudio más amplio por LAL y en conejos analizaron 108 productos inyectables de pequeño volumen con un total de 1200 análisis. Solo se produjo contradicción en el 5% de los análisis. Observaban que con el método LAL podían ahorrarse de un 20 a un 25% de ensayos en animales y que en los casos en que los productos supongan un riesgo para los conejos, pueden ser analizados por LAL.

En este apartado también son de interés las experiencias de Storck (1979) para la heparina: Observó que la heparina cálcica no inhibía la reacción LAL mientras que la sódica la inhibía. Sugería que era debido a la fijación por parte de la heparina sódica del catión cálcico presente en el reactivo LAL y que favorece la reacción de gelificación. Evitaba la inhibición añadiendo a la heparina sódica, cloruro cálcico.

En el caso de los antibióticos Harrison et al (1979) analizaron por LAL y en conejos clindamicina, lincomicina, neomicina y espectinomicina en las concentraciones máximas que no inhibían la reacción LAL. Zink en 1982 señalo que la ticarcilina sódica inhibe la producción de gel si está en concentraciones de 100 mg/mL pero no se produce en

concentración de 10 mg/mL. Además Takashashi et al en 1983 observaron que la ampicilina sódica interfería con el análisis LAL, lo cual se evitaba utilizando la técnica de ultrafiltración.

Soluciones para diálisis peritoneal.

Karanicolas et al (1977) detectaron endotoxina en dos lotes de soluciones para diálisis peritoneal que habían causado peritonitis aséptica en pacientes a los que se les había administrado. Esos lotes fueron negativos en conejos. En la aparición de la peritonitis aséptica no solo fue importante la concentración de endotoxina, sino la cantidad total de la misma administrada, es decir el volumen de líquido perfundido.

Radiofármacos

En este caso el análisis en conejos no es adecuado por el tiempo, tamaño de la muestra y exposición a radiación del personal. La aplicación del análisis LAL a los radiofármacos ha sido estudiada por diferentes autores (Mc Auley et al, 1974; Murata et al, 1976; Merlin, 1979), que indicaban radiofármacos compatibles y no compatibles con LAL.

Es de interés la aportación de Cooper y Pearson (1977) que observaron casos de meningitis aséptica asociada con la administración intratecal de radiofármacos, ya que esta vía es mil veces más sensible que la vía i.v. a la presencia de pirógenos. Estos fármacos habian dado resultados negativos en conejos y positivos por LAL. Concluían que el análisis en conejos es insuficientemente sensible para inyectables intratecales y debe ser complementado por el análisis LAL.

Vacunas

Nyerges y Jaszovsky (1981) estudiaron al capacidad pirogénica de las vacunas en LAL y conejos. Las vacunas tifoidea-tetánica y de virus vivos, parotiditis, sarampión y rubeola mostraron buena correlación entre LAL y conejos. Sin embargo la vacuna de la rabia fue negativa por LAL y positiva en conejos.

Hemoderivados

Patterson y Mc Quillan (1979) analizaron por LAL y en conejos soluciones de proteinas plasmáticas, observando buena correlación. También analizaron lotes de factor VIII concentrado y los resultados mostraban que algunos lotes

daban positivo en conejos y negativo en LAL y posteriormente negativos en clínica. Fusselier et al (1977) señalaban que para los derivados de la sangre humana el LAL puede producir falsos positivos si se utiliza el método cualitativo (gel firme-no gel) y recomendaban utilizar la técnica cuantitativa. El análisis LAL resultó útil para detectar contaminación por endotoxina en lotes de albúmina humana al 25% que había dado negativo en conejos y dió reacciones pirogénicas en el hombre (Mascoli y Weary, 1979).

Material quirúrgico

Kure et al (1982) detectaron pirógenos en catéteres angiográficos utilizando la técnica LAL. La contaminación se producía al manipular estos catéteres con guantes contaminados por endotoxina, produciendo reacciones pirogénicas en pacientes sometidos a angiografía. El análisis LAL también se ha utilizado para control de pirógenos de equipos de infusión i.v. (Mascoli y Weary, 1979).

- Comparación de los métodos LAL y conejos.

Cooper et al (1971) analizaron endotoxina de E. coli en

una concentracion de 1 ng/mL por LAL y en conejos dando positivo el primero y negativo el segundo. Lo mismo ocurrió con endotoxina de Klebsiella dando positivo el LAL con una concentración de 100 pg/mL y negativa en conejo en una concentración de 600 pg/mL. Tambien analizaron endotoxinas en radiofármacos de vida corta; observando casos en los que el análisis en conejos daba negativo y el LAL gelificaba con resultados positivos. Eibert (1972) también encontró buena correlación entre los dos análisis sometiendo a los mismos 84 muestras de 36 productos inyectables diferentes, observando mayor sensibilidad del LAL.

En un estudio multicéntrico Fusselier et al (1977) comunicaron resultados en 1002 muestras de inyectables, materias primas y soluciones para análisis, obteniendo resultados concordantes en el 97.21% de los casos y divergencias para el 2.8%, de las cuales el 2.2% tenia mayor severidad para el análisis LAL. Solo hubo contradicción en el 0.6% de los análisis. En todos los casos realizaron controles de LAL positivo, negativo y de inhibición. Indicaban que el LAL puede ser utilizado para verificar análisis dudosos en conejos y ser sustituto del análisis oficial para algunos productos que no pueden ser

analizados in vivo.

Mascoli (1979) comparó los dos métodos en un gran número de lotes de soluciones i.v. de gran volumen. No hubo en ningún caso resultados LAL negativo que fueran conejos positivo y sin embargo se observó endotoxina por LAL que no fue detectada en conejo.

Pericin (1979) observó concordancia entre los dos métodos para el cefacetrilo mientras que en productos que tenian propiedades coloidales como las soluciones de metilcelulosa o productos proteicos, el LAL no podía ser considerado seguro.

- Ventajas e inconvenientes de los análisis LAL y conejos

Análisis en conejos

Inconvenientes.

Sensibilidad variable en función de dias o estaciones y variación de las temperaturas basales de los animales (Fusselier et al, 1977).

Costo elevado en la iniciación y mantenimiento del programa (Cooper, 1979).

Análisis largo y caro con resultados a veces poco claros (Diding, 1979).

Posibilidad de sensibilización y shock en los conejos (Fusselier et al, 1977).

Ciertos productos no son adecuados y dan reacciones no interpretables (fosfatos, hipertérmicos, antipiréticos, radiofármacos de vida corta, antineoplásicos como la l-asparraginasa, antibióticos como la lincomicina e hipnóticos y sedantes) (Personeus, 1973; Cooper, 1979).

Aparición de tolerancia que puede producir la liberación de lotes con contaminación pirogénica. Variación de sensibilidad a los pirógenos entre laboratorios diferentes (Cooper, 1979).

Ventajas

Corresponde al menos de forma aproximada a un análisis de toxicidad aguda y la sensibilidad del conejo es similar a la del hombre.

Es un procedimiento oficial de investigación de pirógenos de las preparaciones parenterales reconocido por las Farmacopeas (Fusselier et al, 1977).

Análisis LAL

Inconvenientes

El análisis LAL está limitado por su estricta especificidad para endotoxinas de los gérmenes

Gram-negativos (Nyerges y Jaszovszky, 1981).

No permite hacerse una idea de la toxicidad del producto.

No puede utilizarse en todos los casos ya que hay un cierto número de sustancias que interfieren con la reacción de gelificación (Van Noordwijk, 1979).

Ventajas

Es un método más sensible que el de conejos para la detección de endotoxinas de gérmenes Gram-negativos.

Hay sustancias que no pueden ser analizadas en conejos que pueden ser analizadas por LAL (Cooper, 1979).

Es rápido y seguro (Diding, 1979).

El costo es unas tres veces menor que el análisis en conejos ya que precisa poco sitio, material y personal.

Se utiliza poco volumen de solución a analizar (Fusselier et al, 1977).

Cuando el resultado del análisis sobre conejos es dudoso, permite clarificar el resultado un análisis LAL (Rinjard, 1979).

- Normativa análisis LAL

Organización Mundial de la Salud.

El informe 638 de la serie de informes técnicos en 1979, señalaba que aunque se había estudiado la posibilidad de sustitución del análisis sobre conejos por el LAL, este último tiene el inconveniente de no ser especifico más que para endotoxinas de Gram-negativos; se solicitó al Instituto Nacional de Patrones Biológicos e Inspección de Sustancias Biológicas, de Londres, que evaluara la necesidad de preparaciones de referencia adicionales de otros pirógenos y de lisados de Limulus con objeto de estandarizar la sensibilidad de lotes de reactivos de Limulus.

En 1981 el informe 658 comunicaba la iniciación del citado estudio sobre LAL y consideraba que podia suministrar datos útiles para decidir sobre las aplicaciones de ese procedimiento de análisis.

El informe 687 (1983) da cuenta de los resultados de un gran estudio comparativo internacional que se organizó para evaluar la normalizacion efectuada con LAL y las pruebas de pirógenos en conejo. Estuvo organizado por el National Institute for Biological Standards and Control de Londres y se realizó en 43

centros nacionales de inspección y laboratorios de empresas productoras de 19 paises. Los resultados, tanto los obtenidos con lisados codificados como con todos los lotes de lisados locales (muchos de los cuales se preparan con licencia oficial) son irregulares y varían cuando se someten a prueba con 10 endotoxinas codificadas diferentes.
El estudio revela por consiguiente que todavía no se ha logrado normalizar a nivel internacional la detección de endotoxinas con reactivos LAL. El Comité estimó que deben interpretarse con cautela los resultados obtenidos en la prueba LAL.

Farmacopea Europea

Los diferentes grupos de trabajo especializados de la Farmacopea Europea deben precisar los casos en los que el empleo del análisis Limulus debe utilizarse. Por consiguiente las Farmacopeas nacionales, ligadas a la Farmacopea Europea, tomarán las decisiones de ésta próximamente.

En una nota Pharmacy International (1983) comunicaba la aplicación del análisis LAL para endotoxinas, respecto a su inclusión en las Farmacopeas Británica y Europea; su inclusión dependía de una preparación de referencia adecuada.
Ambos, los análisis en conejo y LAL, se incluirán

probablemente en los compendios y cada monografía especificaría que procedimiento era aplicable a una determinada preparación.

La sensibilidad del análisis LAL se espera ajustar a la del conejo, excepto en aquellos casos en los que un estandar más restrictivo se considerara necesario, por ejemplo inyecciones intratecales.

En el informe del Grupo de Expertos sobre LAL para la Farmacopea Europea (Fussellier et al, 1983), se comunica la aprobación del análisis LAL en su inclusión en la Farmacopea Europea desarrollando las variables que influyen en el análisis ya citadas anteriormente. Indicaban que aunque la adición de endotoxinas al LAL produce turbidez, precipitación o gelificación de la mezcla, solo se ha utilizado como método de punto final el método de gelificación. La razón es que los métodos que utilizan turbidez o precipitación no han llegado a ser operacionales.

En un informe complementario (Van Noordwijk y Kruger, 1983), este Comité señalaba los métodos de eliminación de los factores que interfieren con el análisis LAL. Asimismo se incluyeron listas de productos procedentes de diferentes autores o fabricantes que podían interferir con el análisis, lo cual amplia el conocimiento de problemas y soluciones a la

interferencia de diferentes productos con LAL.

Recientemente la Farmacopea Europea ha aceptado el test LAL como análisis de endotoxina pero indica que no sustituirá al de conejos sino que reducirá el número de animales en el estabulario. También expone que se confirmará este ensayo para cada producto, indicándose en la monografía correspondiente el valor límite de endotoxina adecuado (Deutsche Apotheker Zeitung, 1985, 1986).

United States Pharmacopoeia

Banes (1978), director científico de la USP, respondiendo a una pregunta sobre el análisis Limulus dijo: "Si se me pregunta si el análisis LAL será el análisis de pirógenos en la USP XX debo responder que no o al menos "no apto". No está preparado todavía como para proponer que el análisis oficial en conejos sea sustituido por el LAL. Pero se está preparando un capítulo sobre LAL en la USP XX. Si no hay requisitos en las monografías para el análisis, obviamente tendría que estar para información solamente. Pero hay que decir que algunas monografías requerirán la utilización del análisis LAL. Los radiofármacos por ejemplo son excelentes candidatos para el análisis de pirógenos por LAL.

El LAL por tanto será un método oficial solamente para un

limitado número de productos, pero la mayoría de los inyectables deberan ser analizados por el método oficial. Debo decir sin embargo, que la USP indica en las generalidades que si el fabricante tiene un método alternativo que ha sido validado y es predeciblemente dependiente para resultados dados equivalentes a los del análisis oficial, entonces ese método puede ser utilizado como alternativa para demostrar cumplimiento. Si las autoridades reguladoras quieren demostrar no cumplimiento, deberan probarlo utilizando el análisis definitivo en la USP".

La USP XX (1980) incluyó posteriormente análisis Limulus para detección de endotoxinas siendo introducidas las siguientes innovaciones en la USP XXI en 1985:

En la introducción de este análisis concreta que se puede realizar como test límite (gel firme-no gel) y como análisis cuantitativo turbidimétrico o colorimétrico. En el caso de análisis turbidimétrico la lectura es inmediata después del periodo de incubación. Para el análisis colorimétrico la reacción se detiene al final del tiempo de incubación con ácido acético. En todos los casos la determinación del punto final se hace con diluciones de las muestras en comparación con diluciones paralelas de una endotoxina de referencia.

En lo que se refiere a las endotoxinas de referencia y control estandar expone con mayor detalle el procedimiento de estandarización de las endotoxinas. La endotoxina estandar control (EEC) debe contener de 2 a 50 UE/ng. En el apartado de test preparatorio para la eliminación de endotoxina indica la temperatura de 250° o más en tiempo suficiente. El test para confirmación de la sensibilidad etiquetada del lisado indica que deben realizarse 4 repeticiones.

El estudio de inhibición o aumento del análisis debe realizarse con 4 repeticiones en cada nivel de dilución. La muestra es considerada válida para el análisis, si la cantidad de endotoxina detectada está dentro de los límites mitad-doble de la cantidad de endotoxina conocida añadida.

Se introduce el concepto de máxima dilución valida (MDV) que es la máxima concentración de endotoxina que permite la monografia individual(X), dividida por la sensibilidad etiquetada del lisado (S): MVD = X/S.

En el procedimiento de análisis se explica la forma de realización del análisis LAL para equipos de infusión y transfusión sobre los liquidos de lavado teniéndolos en contacto con ellos durante 1 hora.

Cada nivel de dilución de muestra se someterá a dos repeticiones al igual que cada nivel de dilución de la recta de calibrado. El pH se ajustará de 6 a 7.5 con hidróxido sódico o ácido clorhidrico o reguladores adecuados apirógenos. En esta edición XXI de la USP ya no especifica que sean de concentración 0.1 N.

El control positivo debe realizarse con una concentración doble de la sensibilidad etiquetada del lisado. Considera no válido el test si el control positivo del producto o la endotoxina estandar no presentan concentraciones que produzcan gel firme que estén dentro de márgenes de dilución doble-mitad de la sensibilidad etiquetada del lisado. Tambien se considera no válido el test si el control negativo produce gel firme.

Food and Drug Administration.

Este organismo ha dado una Guía para la Validación del LAL como análisis de endotoxina en preparaciones parenterales de utilización humana y animal, preparados biológicos e instrumental médico (Federal Register, 1983, 48). La novedad de mayor interés que incluye esta guía respecto de las anteriores es el límite de endotoxina de las preparaciones parenterales que relaciona con la dosis.

Ya que la dosis varía de un producto a otro, el límite de endotoxina está expresado como K/M. K es 5 UE/kg que representa la dosis umbral pirogénica aproximada en humanos y conejos. M representa la dosis en análisis de pirógenos en conejo o la dosis máxima humana por kg que sería administrada en un periodo de 1 hora. Así en un medicamento cuyo valor de M fuera 10 mL/kg, el límite de endotoxina permitido sería de 0.5 UE/mL.

4. Objeto del trabajo

En los Servicios de Farmacia de Hospital se necesita un método sencillo y rápido de control de pirógenos en los inyectables de propia fabricación y en productos de la industria farmacéutica que han dado reacción de pirógenos en pacientes.

Como objetivos nos hemos propuesto los siguientes:

1. Analizar tres lotes de ampollas de 10 mL, agua para inyección cloruro sódico 0.9% y bicarbonato sódico 8.4%, mediante los métodos de hipertermia en conejos, LAL y microbiológico anterior a la esterilización. Analizar tres lotes de las mismas soluciones contaminadas previamente con recuentos conocidos de E. coli y después esterilizadas, por los tres métodos citados.

2. Estudiar la correlación de estos métodos para deducir la posibilidad de evitar el control en conejo.

3. Mejorar las técnicas de preparación de inyectables de pequeño volumen en el Servicio de Farmacia.

II MATERIAL Y METODOS.

A. Material

Aparatos

- Columna de intercambio iónico Dafa Mar 606.
- Aparato destilador de vidrio Vitrolab .
- Maquina llenadora y cerradora de ampollas Macorra Autofarma 2500.
- Autoclave Labora-Adsuar.
- Aparato esterilizador por óxido de etileno 3M Indos 402B.
- pHmetro Crison digital 501.
- Espectrofotómetro Atom 334.

- Baño de agua termoregulado Precis-Term, Selecta S-141.
- Agitador vibrador para tubos Heidolph 54111.
- Estufa calor seco con circulación por aire forzado Selecta S-140D.
- Estufas de incubación a 37° Memmert BW50.
- Aparato de filtración a vacio Sartorius SM-16551E con filtro.
- Aparato de filtración a presión Sartorius SM-16275.
- Cámara de anaerobiosis Gaspack BBL 60626.
- Microscopio Nikon Labophot.
- Agregómetro Chrono-Log de sangre total.
- Lumiagregómetro Chrono-Log.
- Centrifuga Janetzki T-23.
- Aparato registrador de temperatura termoeléctrico Ellab.

Material desechable

- Jeringas de 1, 5 y 10 mL marca Ico.
- Placas de Petri de 90 mm de diámetro.
- Filtros Sartorius de 100 mm de diámetro y 0.22 μm de poro.
- Puntas de pipeta esteriles y apirógenas para pipetas automáticas Gilford de 100 μL.

Reactivos

- Agua esteril para inyección Travenol lote T11-I21C3.
- Inyectable de ClNa 0.9% Travenol lote U1-A09C2.
- Inyectable de Bicarbonato sódico 8.4% Ibys lote V1T2.
- Reactivo Pyrogent (Mallinckrodt).
- Reactivo Coatest Endotoxin (KabiVitrum).
- Endotoxina E. coli 055:B5.
- Endotoxina E. coli 011:B4.
- Cepas hospitalarias de E. coli Laboratorio de Microbiologia del Hospital Civil de Bilbao.

Animales

- Conejos raza albina Nueva Zelanda de 3-4 kg de peso.

B. Métodos

a. Preparación de las muestras.

- Inyectables no contaminados:

El agua para inyección se producía primero en el aparato desionizador y despues se hacía pasar por el aparato destilador el cual se limpió previamente con mezcla sulfocrómica. Se realizaron controles microbiológico y LAL a lo largo del proceso de producción del agua.

Se prepararon tres lotes de 500 ampollas en el Servicio de Farmacia del Hospital Civil de Bilbao con las fórmulas que se indican (Pozo, 1978):

Agua esteril para inyección de 10 mL
Esterilización a 120°, 30 min.

Inyectable de cloruro sódico al 0.9% de 10 mL
Cloruro sódico ..... 9 g
Agua para inyeccion csp ..... 1000 mL
Esterilización a 115°, 30 min.

Inyectable de bicarbonato sódico 8.4% de 10 mL

Bicarbonato sódico ..... 84 g

Agua para inyección csp ..... 1000 mL

Esterilización a 121°, 20 min.

Todo el material de vidrio y metal que estuvo en contacto con la solución se hizo esteril y apirógeno mediante tratamiento en estufa de calor seco a 250° durante 30 minutos (USP XXI, 1985, p. 1181) y el material de goma y plástico se sometió a esterilización por óxido de etileno a 63°, durante 170 minutos con humedad relativa del 40-50%(Moreno, 1982). En todos los casos se realizaron controles mediante análisis LAL para confirmar la ausencia de endotoxina en el material utilizado.

Para los tres lotes se realizaron controles del medio de cultivo utilizado, agua destilada esteril y agua recogida directamente a la salida del bidestilador siendo en todos los casos los resultados negativos.

Una vez preparada la solución se sometió a filtración a traves de membranas de 0.22 µm de poro y posteriormente se procedió al llenado y cerrado de las ampollas en la máquina. Se separaron muestras del principio y del final del lote para recuentos microbiológicos y el resto de las ampollas se

sometió a esterilización en autoclave a las temperaturas indicadas en la fórmula correspondiente.

- Inyectables contaminados

Segun la técnica de Marcus (1964) se prepararon diluciones de E. coli en agua para inyección, cloruro sódico al 0.9% y bicarbonato sódico al 8.4%, demostradas previamente apirógenas, en concentraciones de 10.000, 1000, 100 y 10 colonias por mL partiendo de una concentración inicial de 100.000 gérmenes por mL.

Se tomaron muestras alicuotas de las diluciones 1.000, 100 y 10 germenes/mL y se filtró a través de membrana de 0.45 µm incubando despues a 37° sobre placa de agar Mc Conkey durante 24 horas. El resto de la solución se distribuyó en ampollas de 10 mL (3 por dilución y tipo de muestra) y viales de 40 mL (8 por dilución y tipo de muestra) que se sometieron a esterilización a 120° , 20 min. Las ampollas fueron analizadas por LAL y los viales en conejos. De esta forma podían ser comparados los resultados con los de los inyectables preparados de forma estandar.

b. Metodos de valoración

1. Recuento microbiológico.

Se ha utilizado el método de filtración de membrana descrito por la Farmacopea Europea (1980) para detectar la presencia de formas viables de bacterias, hongos y levaduras utilizando medios de cultivo apropiados .

Los medios de cultivo que se exponen a continuación son los indicados en el citado compendio oficial con modificaciones del Prof. Cisterna. Estos medios fueron controlados respecto a esterilidad, propiedades nutritivas y fertilidad segun las especificaciones de la Farmacopea Europea.

Medios de cultivo

- Gérmenes aerobios:

Caldo de Mueller-Hinton (Difco Ref. 075701)

Infusión de carne ..... 300 g/l

Aminoácidos de caseina ..... 17.5 "

Almidon ..... 1.5 "

Para rehidratar el medio se suspendieron 21 g en 1000 mL de agua destilada llevando a ebullición hasta disolución completa. Se distribuyeron en tubos de ensayo y se esterilizaron en autoclave a 121°, 15 min; pH final 7,4 a 25°.

Agar-sangre con triptona y soja (Oxoid Code CM 131)

Triptona (Oxoid L42) ..... 15 g/l

Soitona (Oxoid L44) ..... 5 "

Cloruro sodico ..... 5 "

Agar No. 3 (Oxoid L13) ..... 15 "

Suplementado con sangre esteril de caballo (Oxoid SR 50) al 5%.

Para preparar el medio se suspenden 40 g en 1 litro de agua destilada. Se lleva a ebullición hasta disolución completa. Se esteriliza en autoclave a 121° ,15 min y se conserva herméticamente cerrado en lugar frio y protegido de la luz; pH final 7,3 a 25°.

- Gérmenes entéricos Gram-negativos:

Agar Mc Conkey (Oxoid Code CM 115)

Peptona ..... 20 g/l

Lactosa ..... 10 "

Sales biliares ..... 1.5 "

Cloruro sódico ..... 5 "

Rojo neutro ..... 0.03 "

Violeta cristal ..... 0.001 "

Se suspenden 51.5 g en 1 litro de agua destilada. Se lleva a

ebullición hasta disolución completa. Se esteriliza en autoclave a 121°, 15 min. Se conserva hermeticamente cerrado y protegido de la luz. pH 7.1 a 25°.

- Gérmenes anaerobios:

Tioglicolato (Difco Ref 025601)

Caseina	15	g/l
Extracto de levaduras	5	"
Dextrosa.....	5.5	"
Cloruro sodico	2.5	"
L-cistina	0.5	"
Tioglicolato sodico	0.5	"
Agar	0.75	"
Resazurina	0.001	"

Se suspendieron 29.8 g en 1 litro de agua destilada y se llevó a ebullición hasta disolución completa. Se distribuyeron en envases y se esterilizaron a 121°, 15 min en autoclave. Si no se utiliza en el mismo día se almacena en nevera de 2-8°. pH final 7,1 a 25°.

Agar Brucella (Oxoid Code CM691)

Triptona	10	g/l
Peptamina	10	"
Dextrosa	1	"
Extracto de levaduras	2	"
Cloruro sódico	5	"
Bisufito sódico	0.1	"
Agar	15	"

Suplementado con cloruro de L-cisteina (monohidrato) (Merck Ref. 2839), menadiona, hemina y sangre esteril de caballo (Oxoid SR 50). Se suspendieron 43 g en 1 litro de agua destilada y se llevaron suavemente a ebullición hasta disolución completa. Se esterilizó en autoclave a 121° , 15 min. Se almacenó distribuido en envases herméticamente cerrados en lugar frio y protegido de la luz; pH final 7, a 25° .

- Medios para investigacion de hongos y levaduras:

Mueller Hinton (ya citado).

Medio Sabouraud agar modificado (Difco Ref 0747-01)

Neopeptona	10	g/l
Dextrosa	20	"
Agar	20	"

Para rehidratar el medio se suspendieron 50 g en 1000 ml de agua destilada fria y se llevaron a ebullición hasta disolución completa. Se distribuyeron en los envases y se esterilizaron en autoclave a 121° durante 15 min. y pH final 7.0 a 25°.

Procedimiento de filtración

Se filtró a través del dispositivo de la figura 5, que lleva incluido un filtro de nitrato de celulosa de 0.45 µm de poro, 47 mm de diámetro y velocidad de flujo de 55 a 75 mL de agua a una presión de de 70 cm de mercurio. Se limpiaron las superficies exteriores de las ampollas y de los viales con alcohol 70% y se tomó el contenido de forma aséptica (Ph. Eur., 1980, cap. V.2.1.1.).

- Inyectables no contaminados

  Se analizaron en total 36 unidades del producto (18 del principio de lote y 18 del final del lote), que se distribuyeron del modo siguiente: En cada grupo, 6 ampollas eran para detección de gérmenes aerobios, 6 para anaerobios y 6 para hongos y levaduras.

  Con cada muestra se hizo pasar primero por el filtro 5 mL de medio de cultivo específico y a continuación 10 mL de

Figura 5. Aparato de filtración para recuento bacteriano.

muestra (mínimo de 2 mL se especifica en Ph. Eur., 1980, cap. V.2.1.1. para muestras de volumen comprendido entre 4 y 20 mL).

Se separó asépticamente la membrana del aparato de filtración con una pinzas flameadas. Para el recuento de aerobios, los 12 filtros extraidos se colocaron en placas de agar sangre con triptona y soja y se incubaron en estufa a 37°; los filtros para recuento de anaerobios en placas de agar Brucella y cámara de anaerobiosis a 37°; los filtros para investigación de hongos y levaduras se dividieron en dos partes con un escalpelo flameado y se incubaron la mitad a 37° y la mitad a temperatura ambiente en placas de agar Sabouraud.

Para aerobios y anaerobios las lecturas se realizaron hasta los 14 días de incubación y las de hongos y levaduras hasta los 30 días.

- Soluciones contaminadas

Se hizo pasar previamente por cada filtro 5 mL de medio de Mueller-Hinton. De cada una de las diluciones de E. coli preparadas en las soluciones demostradas previamente apirógenas (agua para inyección, cloruro sódico 0.9% y bicarbonato sódico 8.4%), se tomaron muestras del modo

siguiente: 6 muestras de 0.1 mL para cada dilución de 10.000 gérmenes/mL y 6 muestras de 1 mL para cada una de las diluciones de 1000, 100 y 10 gérmenes/mL.

Se realizó la filtración, se separaron los filtros y se colocaron sobre placa de agar Mc Conkey en estufa a 37° durante 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se hizo el recuento de gérmenes viables, expresando los resultados en número de colonias por mL de muestra filtrada. Este número se compara con los resultados obtenidos en el análisis de pirógenos por el método en conejo y el método LAL, en los inyectables preparados con el resto de las soluciones contaminadas, una vez esterilizados.

2. Análisis con lisado de amebocitos de Limulus (LAL).

Se utilizan materiales y procedimientos comercializados. Se han ensayado dos métodos. El primero "Pyrogent" de la firma Mallinckrodt es cualitativo, es decir da lecturas de gel firme-no gel. La apariencia del gel es insegura. El segundo método "Coatest endotoxin" de la firma Kabi Vitrum mide por fotocolorimetría el color desarrollado en una reacción enzimática que es linealmente proporcional a la cantidad de endotoxina presente y se obtienen valores de concentraciones de endotoxina del orden de pg/mL.

a) LAL "Pyrogent"

- Preparación del reactivo LAL

Al reactivo liofilizado se le añaden 1.2 mL de agua para inyección esteril y apirógena. Se agita suavemente y se conserva en hielo. Se distribuye asépticamente a razón de 0.1 mL en tubos apirógenos de diámetro menor de 7.5 mm.

- Preparación de la muestra

Se ajusta el pH entre 6 y 7.5. En el caso del bicarbonato sódico al 8.4%, con ClH 0.1 N apirógeno; el cloruro sódico 0,9% con NaOH 0.1 N apirógena. No se ajustó el pH del agua para inyección.

- Preparación de la solución control positivo

Se partió de un vial de endotoxina E. coli 055:B5 (1 ng equivale a 10 UE comparada con el estandar de la FDA), que contiene 10 ng se reconstituyó con 5 mL de agua esteril y apirógena, agitando durante 5 minutos. Queda a una concentración de 2 ng/mL. Se diluye hasta 50 pg/mL que se utilizó como control positivo. En el caso de la solucion de bicarbonato sódico al 8.4% se realizaron controles de inhibición; comparando soluciones de pH ajustado y sin ajustar en concentraciones de endotoxina de 10 y 100 pg/mL.

- Ensayos preliminares

Tubo número 1: Es el control negativo y contiene 0.1 mL de reactivo LAL con 0.1 mL de agua para inyección esteril y apirógena.

Tubo número 2: Es el control positivo y contiene 0.1 mL de endotoxina de E. coli en la concentración indicada y 0.1 mL de reactivo LAL.

Tubo número 3: Es el control de inhibición y contiene 0.1 mL de endotoxina diluida en la solución a analizar y 0.1 mL de LAL.

Para interpretacion de los resultados ver la tabla 10.

Tabla 10. Interpretación resultados LAL "Pyrogent"

Tubo	1	2	3	Interpretación	Decisión
Caso 1	No gel	Gel firme	Gel firme	Resultados conformes	Proceder al análisis
Caso 2	No gel	Gel firme	No gel	Inhibición o manipulación	Estudiar el grado de inhibición
Caso 3	No gel	No gel	No gel	Actividad del LAL destruida	Repetir con otro LAL
Caso 4	Gel firme			Contaminación agua utilizada	Repetición

- Precauciones de procedimiento

Debe evitarse durante la incubación y el manejo de los tubos movimientos bruscos, ya que el gel que forma el LAL en presencia de endotoxina es fragil y puede romperse de forma irreversible dando falsos negativos.

- Sensibilidad del LAL "Pyrogent"

El reactivo LAL "Pyrogent" cuando se utiliza de acuerdo con los procedimientos descritos detecta endotoxina en un margen de 8 a 250 pg/mL de endotoxina. En nuestras experiencias la sensibilidad etiquetada del lisado fué de 0.05 UE/mL (5 pg/mL).

b) LAL "Coatest endotoxin"

La endotoxina de bacterias Gram negativas cataliza la activación de un sistema enzimático en los amebocitos del Limulus. Se ha demostrado que el enzima activado rompe ciertos sustratos cromogénicos para formar un producto coloreado (figura 6) que puede ser medido fotométricamente. La cantidad de color desarrollada es linealmente proporcional a la cantidad de endotoxina presente.

En el caso de este reactivo el sustrato cromogénico es un péptido formado por 5 aminoácidos y paranitroanilina (pna). El

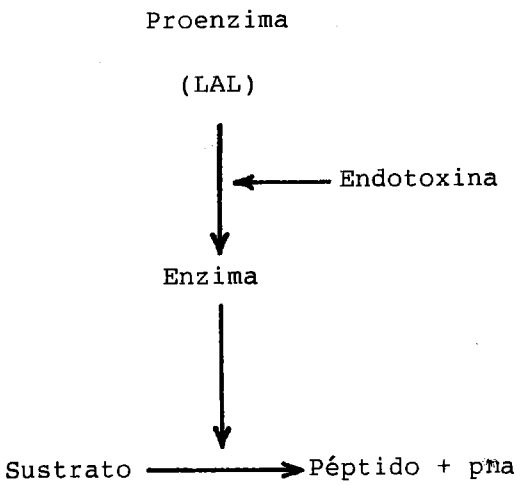


Figura 6. Mecanismo de actuación de la endotoxina en el método LAL sustrato cromogénico (Friberger et al, 1982).

enzima formado cataliza la separación de la pna del péptido. Después de detener la reacción con ácido acético, el grado de liberación de pna se mide a 405 nm. La correlación entre la absorbancia (A) y la concentración de endotoxina es lineal en el margen 10-100 pg/mL.

Las precauciones del método son similares a las del otro método LAL anteriormente expuesto (trabajar con material apirógeno, estricto cumplimiento de temperaturas y tiempos etc).

- Reactivos

Sustrato S-2423. El vial contiene 9 ng de sustrato cromogénico liofilizado con manitol añadido como excipiente. Se reconstituyó con 6 mL de agua esteril y apirógena. La solución asi preparada es estable durante 1 mes de 2-8°.

LAL. El reactivo LAL liofilizado procede de Withaker M.A. Bioproducts Walkersville, MD, USA. Se reconstituyó el vial con 1.4 mL de agua esteril y apirógena y se agitó suavemente para evitar la formación de espuma, el LAL se conservó en hielo y fué utilizado en 30 minutos.

Endotoxina (E. coli 0111:B4). El vial contiene 2 ng, equivalentes a 25 UE del estandar FDA EC-5 de endotoxina liofilizada en albúmina. Se reconstituyó con 1 mL de agua

esteril y apirógena a temperatura ambiente para conseguir una concentración de 2 ng/mL y se agitó vigorosamente sobre vortex. La vida de esta solución de stock es de 2 semanas a 2-8° asegurando que no exista contaminación. Antes del uso posterior la solución se calentó a temperatura ambiente y se agitó vigorosamente durante 1 minuto.

Regulador. Tris - hidroximetil - aminometano 0.05 M pH 9 (KabiVitrum) esteril y apirógeno. La solución es utilizable durante 1 mes de 2 a 8° después de abierta si no se produce contaminación.

Agua esteril y libre de pirógenos. Utilizable durante 1 mes de 2-8° despues de abierta, si no se produce contaminación.

Sustrato-solución reguladora. Para utilización diaria se mezcló 1 mL de S-2423 y 1 mL de solución reguladora. La mezcla es estable durante 8 horas a 20-25° si no se produce contaminación.

- Recogida de muestras y preparación

Las muestras se recogieron y almacenaron de forma que se evitara la contaminación microbiana. Se almacenaron de 2-8°. Antes del análisis la muestra se calentó a temperatura ambiente y se agitó.

En las muestras de bicarbonato sódico 8.4% se ajustó el pH de la muestra de 7 a 8 utilizando ClH 1 N apirógeno. Se midió el pH siempre de una parte alicuota del total para evitar la contaminación por el electrodo del pHmetro.

- Procedimiento

100 µL de la muestra se calentaron a 37° durante 3-5 minutos y se añadieron 100 µL de LAL. Se mezclaron suavemente y se incubaron a 37° durante diez minutos exactamente. Se añadió 200 µL de solución sustrato-regulador previamente calentada a 37°. Se mezclaron e incubaron a 37° durante tres minutos. Se añadieron 200 µL de ácido acético al 50% para paralizar la reacción.

Se comenzó a contar el tiempo cuando se añadió el LAL a cada tubo y debe continuar sin interrupción hasta la última etapa. En una serie de análisis se comenzó un nuevo análisis cada 15 segundos (12 determinaciones en cada serie).

Se leyó la absorbancia (A) de las muestras y los estandares frente agua en un espectrofotómetro a 405 nm. El color es estable durante por lo menos 4 horas.

- Control inicial de calidad de procedimiento

Se realizaron rectas de calibrado con las diluciones que se indican en la tabla 11. Todas las diluciones de endotoxina se agitaron completamente y se conservaron a temperatura ambiente durante el trabajo. Se realizó el análisis de estas diluciones como una muestra más y se representaron los valores obtenidos en gráfica, las absorbancias frente a las concentraciones.

Tabla 11: Diluciones de endotoxina para recta de calibrado.

Tubo	Concentración endotoxina pg/mL
1	100
2	75
3	50
4	25
5	12.5

3. Análisis en conejos.

Se ha realizado según método USP XXI (1985) p 1181. El análisis consiste en la medida del aumento de temperatura de los conejos después de la inyección intravenosa de la muestra a analizar y está diseñado para productos que pueden ser tolerados por el análisis en conejos en una dosis no mayor de 10 mL/kg, inyectados intravenosamente en un periodo máximo de 10 minutos. Para productos que requieren preparación preliminar o condiciones especiales de administración, deben seguirse las instrucciones específicas de la monografía individual.

- Aparatos y diluyentes.

  Se despirogeneizaron las jeringas, agujas y vidrio por calor seco en estufa de convección forzada a 250° durante un periodo de 30 minutos.

- Registro de temperatura

  Se utilizó un instrumento termoeléctrico calibrado para asegurar una precisión de 0.1° que puede alcanzar una lectura de temperatura máxima en menos de 5 minutos. Se insertaron los termómetros dentro del recto del conejo a una profundidad mayor de 7.5 cm, y, se registró la temperatura corporal del conejo.

- Animales para el análisis

Se utilizaron conejos sanos y maduros de raza albina. Se almacenaron los conejos individualmente en un área de temperatura uniforme entre $20 \pm 3°$ y libre de molestias que pudieran excitarlos. Antes de utilizar un conejo por primera vez en un análisis de pirógenos se había sometido, en los 7 días anteriores, a un test de muestreo que incluyó todas las etapas como se describe en el procedimiento, excepto la inyección.

No se utilizó un conejo para análisis de pirógenos más de una vez cada 48 horas y no antes de 2 semanas despues de haber sufrido un aumento de temperatura de 0.6° o más mientras estuvo sometido al análisis de pirógenos, o después de habersele administrado una muestra que hubiera resultado pirogénica.

- Procedimiento

Se realizó el análisis en un área separada diseñada unicamente para análisis de pirógenos. Se retiró toda la comida a los conejos durante el periodo del análisis. El agua se

suministró libremente.

Se sujetó a los conejos ligeramente por el cuello de forma que pudieran tener una postura natural de descanso. Se determinó la temperatura de control de cada conejo durante los 30 minutos anteriores a la inyección de la dosis de análisis: esta temperatura es la base para la determinación de cualquier incremento resultante de la inyección de la muestra.

En cada grupo de conejos del análisis, se utilizaron solo aquellos cuyas temperaturas control no variaron más de 1° entre ellas, y no se utilizaron los que tenían una temperatura que sobrepasara los 39.8° .

Se inyectó en la vena marginal de la oreja de cada uno de los tres conejos el volumen especificado en la monografía individual de USP XXI, 1985 para cada muestra: 10 mL/kg para las muestras de agua para inyección (p 1123) y cloruro sódico 0.9% (p 966), y 5 mL por kg para las de bicarbonato sódico 8.4% (p 965), completando cada inyección en 10 minutos desde del comienzo de la administración.

Antes de inyectar, se calentó la muestra a una temperatura de $37 \pm 2°$. Se registró la temperatura 1, 2 y 3 horas después

de la inyección.

Se sometieron a este método de análisis en grupos de tres conejos cada uno de los lotes de inyectables no contaminados y cada tipo y dilución de inyectables previamente contaminados con E. coli y después esterilizados.

El agua para inyección se hizo previamente isotónica con cloruro sódico sometido a despirogeneización en viales que contenían 450 mg del mismo para diluir con el agua destilada a analizar en csp 50 mL, consiguiendo una concentracion final del 0.9%. Para conseguir el cloruro sódico apirógeno se sometieron los viales cubiertos con papel de aluminio a 200° durante una hora según indica Personeus (1973).

También se inyectó a 8 conejos 10 ng/kg de endotoxina E. coli 055:B5 para estudiar los incrementos de temperatura producidos y verificar que la colonia en la que se habían realizado los análisis daba respuestas pirogénicas positivas.

4. Método de medida de la agregación plaquetaria producida por endotoxina

a. Método de Born y Cross (1963) en plasma rico en plaquetas (PRP)

Es un método fotométrico basado en la medida de los cambios de transmisión de la luz que ocurren durante el proceso de agregación plaquetaria. El procedimiento empleado es el siguiente:

Se obtiene la sangre por extracción de una de las venas de la cara anterior del codo utilizando como anticoagulante el citrato sódico al 3.15 % en la proporción 1/9.

Se prepara un PRP, centrifugando la sangre 1200 rpm durante 10 minutos y separando el sobrenadante. El resto se centrifuga a 12000 rpm durante 5 minutos más para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). Se utilizan individuos con recuentos de plaquetas entre 150.000 y 300.0000 plaquetas/mm^3. Se establece la linea de base colocando en el tubo del agregómetro 0.45 mL de PPP.

Se colocan 0.45 mL de PRP ajustados a 150.000 plaquetas/mm^3 en el tubo del agregómetro y se añade el agente agregante (ADP o endotoxina) en un volumen fijo que se determina en cada caso. Un registrador conectado al agregómetro nos dará una gráfica

de la agregación. El cálculo se realiza sobre la gráfica. El parámetro de mayor interés es:

- Agregación máxima (AM). Expresa en % la altura alcanzada respecto a la linea de base (aumento del paso de luz).

Otros parámetros que se tienen en cuenta con algunos agentes agregantes son:

- Velocidad de agregación. Expresa el % de agregación que se ha producido en el primer minuto.

- Tiempo de latencia. Tiempo transcurrido desde la introducción del agente agregante y el inicio de la agregación.

- Cambio de forma: expresa el cambio de forma de las plaquetas y se traduce por una disminución del paso de luz.

b. Metodo de agregación en sangre total (Cardinal y Flower, 1980).

Consiste en registrar los cambios de impedancia que se producen entre dos electrodos situados en el interior de la cubeta del agregómetro (figura 7)

Según observaciones realizadas con microscopía electrónica por el mismo autor cuando se colocan los electrodos en la cubeta del agregómetro, estos quedan recubiertos por una monocapa de plaquetas. Si no se añade ningún agente agregante, no hay más

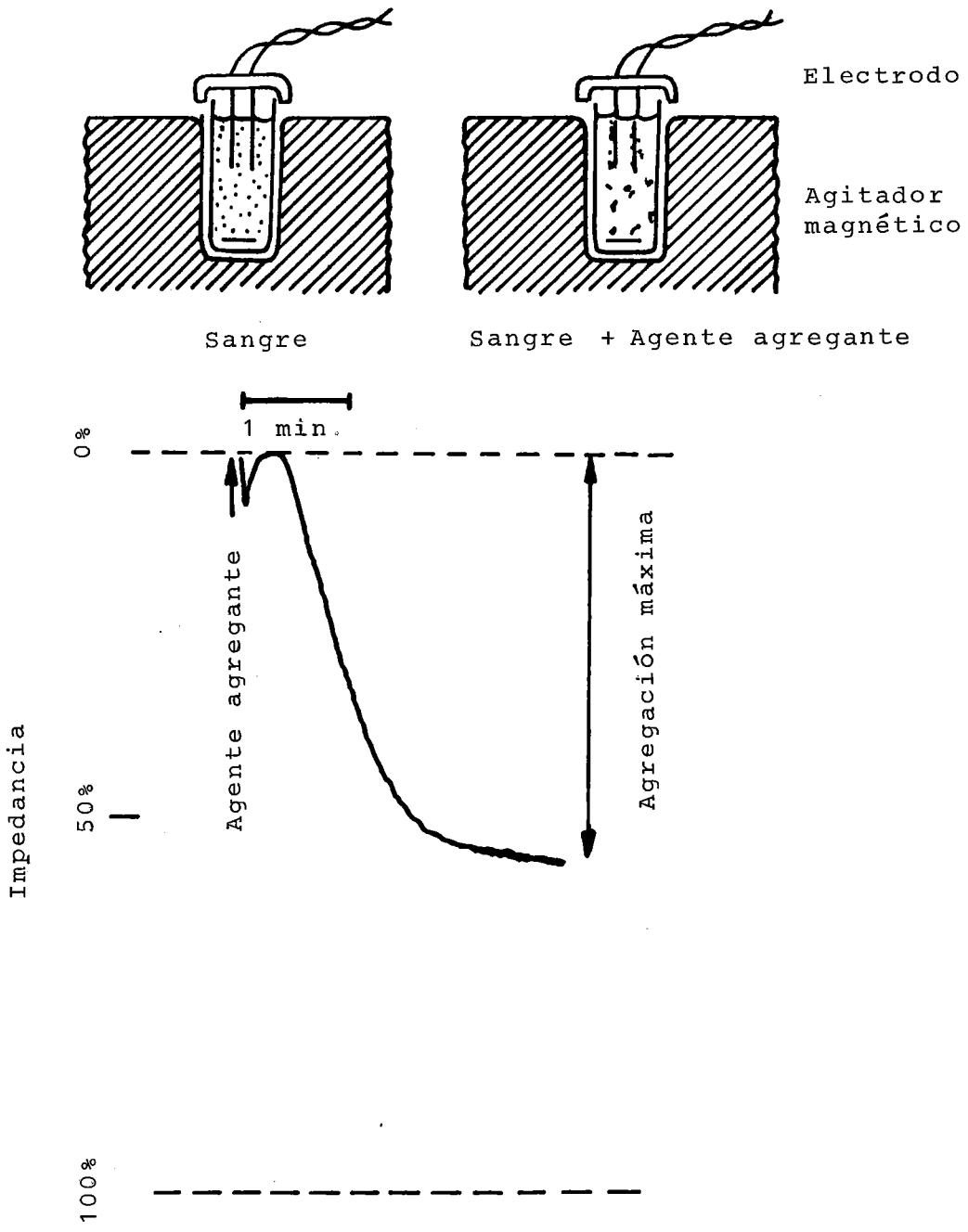


Figura 7. Fundamento del método de agregación plaquetaria en sangre total (Cardinal y Flower, 1980).

interacciones entre las plaquetas y los electrodos y la conductancia entre ambos electrodos se mantiene constante.

Si se añade un agente agregante las plaquetas se agregan sobre la monocapa que se ha formado previamente: estos agregados interfieren la conducción entre los electrodos con lo que se produce un aumento de la impedancia. Al igual que con el lumiagregómetro con la técnica de Born, la magnitud de la respuesta es proporcional al recuento de plaquetas.

- Realización del ensayo

Las muestras de sangre se obtuvieron de 3 voluntarios sanos. Se extrae sangre de la vena anterior del codo con el siguiente anticoagulante: heparina 2 U/mL y citrato sódico al 1% en la proporción 1 en 9 de sangre. Se coloca en la cubeta del agregómetro 1 mL de sangre total y se introducen lo electrodos en la cubeta.

Se ajusta la linea de base y se procede a añadir el agente agregante: en nuestro caso endotoxina en diferentes concentraciones, 2.5, 12.5 y 25 μg, y ADP 2.5 y 5 μM sobre la agregación plaquetaria en sangre total y en plasma rico en plaquetas.

Tambien se investigó la posible potenciación de la agregación producida por endotoxina con el agente agregante ADP en concentraciones de 2.5 y 5 μM.

III RESULTADOS

1. Analisis microbiológico anterior a la esterilización

a) Inyectables no contaminados

- Ampollas de agua para inyección (Lote S-100)

Gérmenes anaerobios

No se detectó crecimiento.

Hongos y levaduras

No se detectó crecimiento.

Gérmenes aerobios

Se obtuvieron los resultados que se indican en la tabla 12.

Tabla 12: Recuentos de gérmenes aerobios en agua para inyección sin contaminar.

Muestra	Número gérmenes/10 mL	
1 P	68	
2 P	61	$\bar{x}_p = 63,66$
3 P	59	$s = 8,7$
4 P	54	$s_x = 3,6$
5 P	79	$s_r = 13,7$
6 P	61	
1 F	19	
2 F	16	$\bar{x}_f = 14.16$
3 F	12	$s = 4.2$
4 F	14	$s_x = 1.74$
5 F	7	$s_r = 30$
6 F	17	

P = Ampollas del principio del lote

F = Ampollas del final del lote

$t = 12.45$ $p << 0.0001$

Hay diferencias muy significativas

No pudo identificarse el germen. Solo se detectó como bacilo no fermentador. Se encuentran diferencias significativas entre las ampollas del principio del lote (P) y las del final (F). Estas diferencias carecen de importancia porque en todos los casos los valores mayores del número de gérmenes son inferiores a 100 por mL.

- Inyectable de cloruro sódico 0.9% (Lote S-200)

Gérmenes anaerobios

No se detectó crecimiento.

Levaduras y hongos

No se detectó crecimiento.

Gérmenes aerobios

Los recuentos se indican en la tabla 13. Se aislaron Pseudomonas putida fluorescens y Staphylococcus coagulasa negativo. Hay diferencias significativas entre el principio y el final del lote pero sin importancia pues todos los recuentos son inferiores a 100 gérmenes/mL.

Tabla 13: Recuentos de gérmenes aerobios en inyectable de cloruro sódico 0.9% anterior a la esterilización.

Muestra	Número gérmenes/10 mL	
1 P	458	
2 P	332	$\bar{x}_p$ = 432,5
3 P	427	s = 150,50
4 P	653	s_x = 61,45
5 P	511	s_r = 34,8
6 P	214	
1 F	46	
2 F	42	$\bar{x}_f$ = 32,5
3 F	21	s = 9,77
4 F	26	s_x = 3,9
5 F	33	s_r = 30
6 F	27	

P = Ampollas del principio del lote

F = Ampollas del final del lote

t = 6.49 p << 0.0001

Hay diferencias muy significativas

- Comparación de los recuentos en agua y en cloruro sódico 0.9%.

Muestras P del comienzo de los lotes

t = 6 $p<0.0001$

Se contamina mucho más el cloruro sódico al 0,9% del comienzo del lote.

Muestras F del final del lote

t = 4,2 $p<0.0009$

Hay diferencias significativas en los recuentos de los finales de los lotes (aunque se puede considerar que las diferencias son algo más significativas en el principio del lote).

- Bicarbonato sódico 8.4% (Lote S-300)

Gérmenes anaerobios

No se detectó crecimiento.

Levaduras y hongos

No se detectó crecimiento.

Gérmenes aerobios

No se presentó crecimiento en ninguno de 11 filtros. En uno se aisló 1 colonia de Staphylococcus epidermidis.

b) Soluciones previamente contaminadas con E. coli.

De acuerdo con el planteamiento de las experiencias indicado en Material y Métodos, se realizaron distintas diluciones de E. coli en tres soluciones iguales que los inyectables que iban a ser analizados pero que previamente se habían demostrado apirógenas por LAL.

Estos recuentos realizados sobre filtro de 0.45 µm, dieron los resultados que se indican en la tabla 14 para las soluciones de agua, cloruro sódico 0.9% y bicarbonato sódico 8.4% y en la figura 8 se expone una placa con el filtro y recuento de colonias.

Tabla 14. Recuentos en soluciones contaminadas con E. coli (número de gérmenes por mL).

Número de gérmenes teórico	Número de gérmenes viables
	Media de recuentos en 6 filtros
Cloruro sódico 0.9%	
10.000	5187
1.000	484
100	50
10	4
Agua para inyección	
10.000	15
1.000	8
100	1
10	0
Bicarbonato sódico 8.4%	
10.000	6
1.000	2
100	0
10	0

Figura 8. Placa con filtro para recuento bacteriano.

2. Análisis con lisado de amebocitos de Limulus

a) Inyectables no contaminados

- Agua para inyección

LAL "Pyrogent". Mediante este método de gel firme - no gel se realizaron análisis de 12 muestras del lote de agua para inyección. Todas dieron ausencia de gel, igual que el control negativo (figura 9).

LAL "Coatest endotoxin". Se realizó recta de calibrado con sucesivas concentraciones de endotoxina con los resultados que se indican en la tabla 15 y figura 10. Las concentraciones de endotoxina halladas para las muestras se exponen en la tabla 16.

- Cloruro sódico al 0.9%

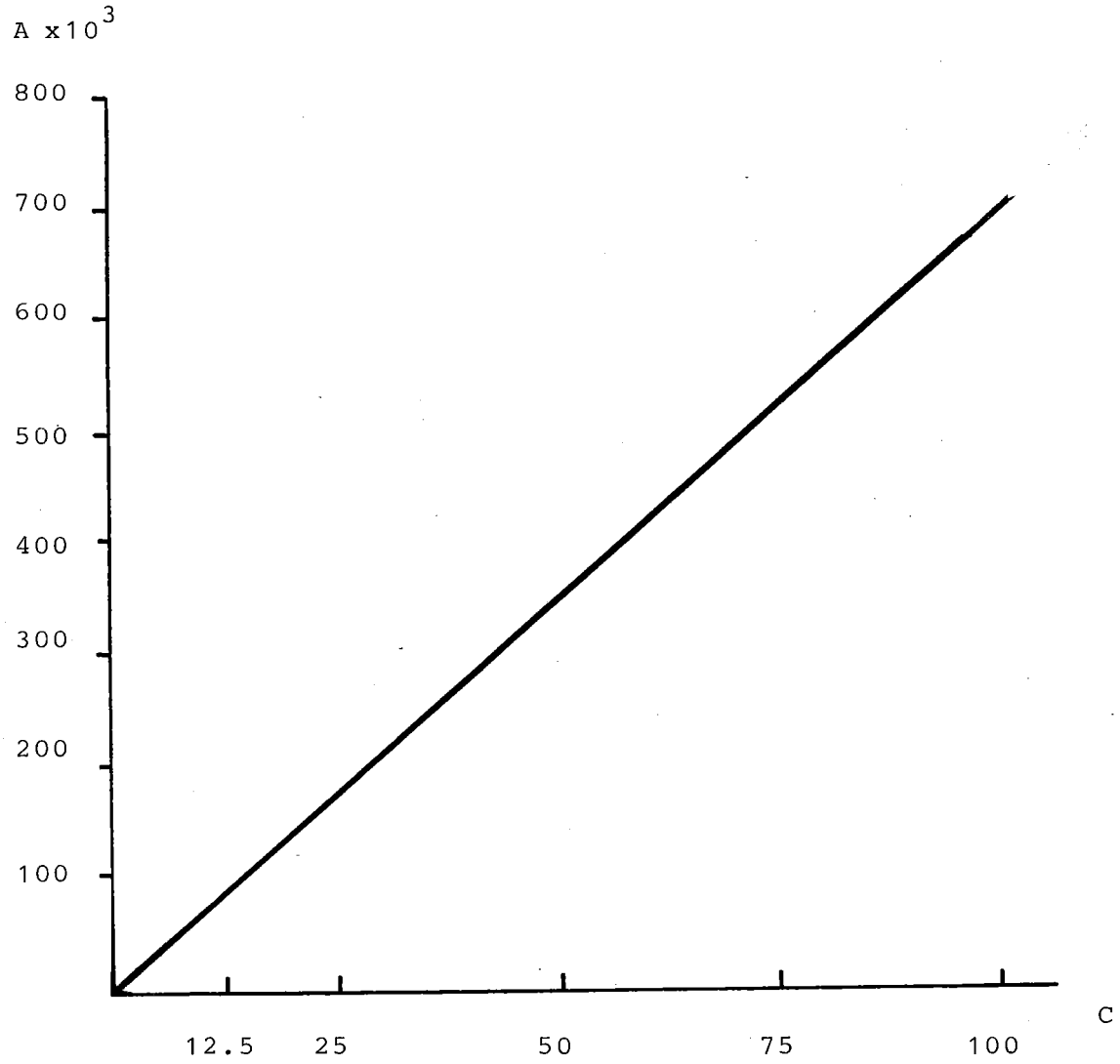
LAL "Pyrogent". El resultado fue para todas las muestras negativo.

LAL "Coatest endotoxin". Se realizó recta de calibrado con sucesivas concentraciones de endotoxina con los resultados que se indican en la tabla 17 y figura 11. Las concentraciones de endotoxina halladas para las muestras se exponen en la tabla 18 .

Figura 9. Controles negativo y positivo en LAL "Pyrogent".

Tabla 15: Valores para la recta de calibrado en agua para inyección.

Concentración endotoxina en pg/mL	Absorbancias, 405 nm n = 5					$\bar{A}$
12.5	0.080	0.081	0.101	0.097	0.093	0.090
25	0.210	0.186	0.176	0.162	0.195	0.186
50	0.380	0.393	0.376	0.380	0.303	0.366
75	0.599	0.567	0.574	0.515	0.445	0.540
100	0.752	0.765	0.760	0.676	0.647	0.720



r = 0.99 y = 2.80 + 7.18x

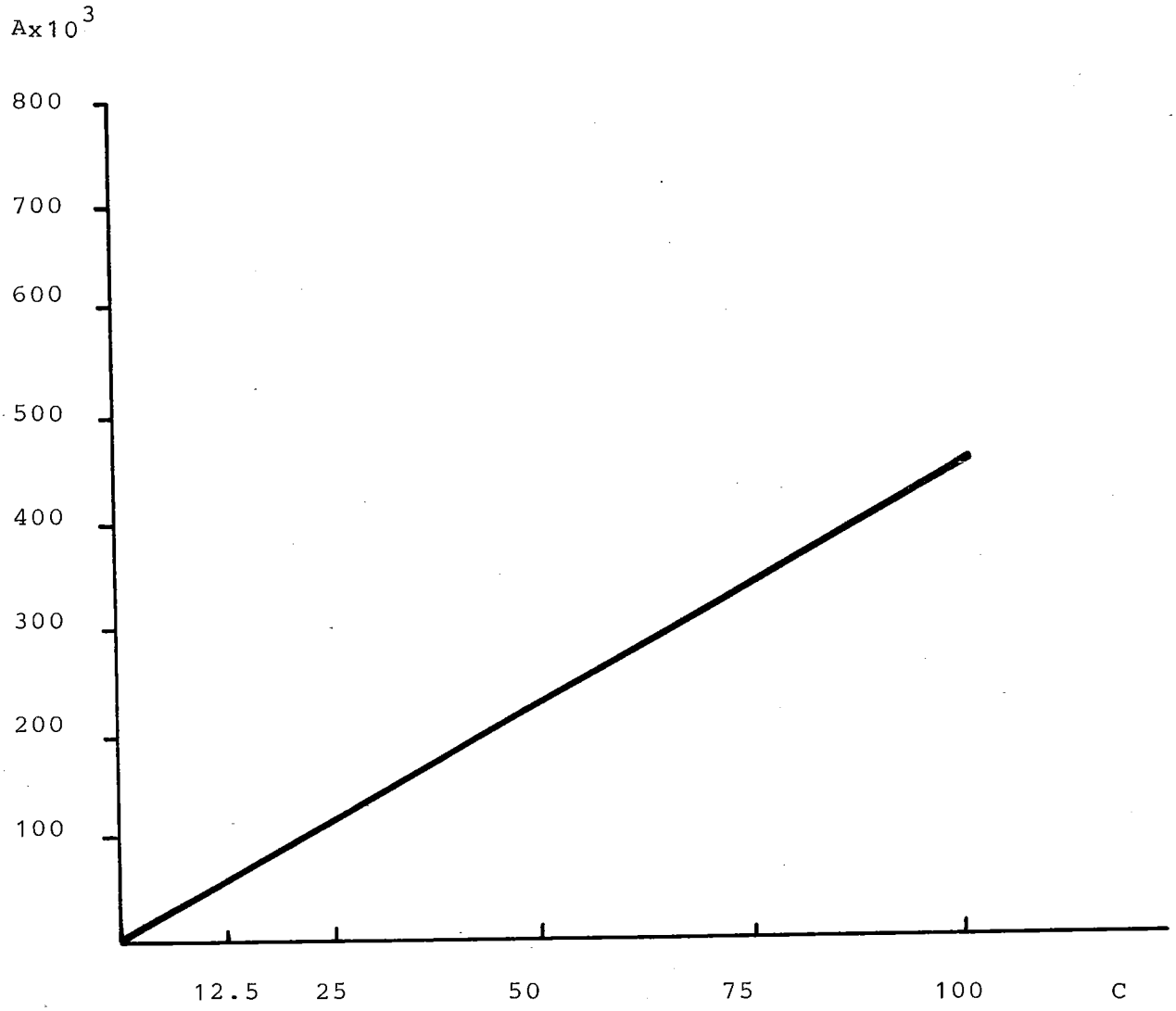
Figura 10. Recta de calibrado en agua para inyección. A, absorbancia a 405 nm; C, concentración de endotoxina en pg/mL.

Tabla 16: Concentraciones de endotoxina en las ampollas de agua para inyección no contaminadas.

Muestra	Absorbancia 405 nm	Concentración endotoxina en pg/mL
1	0.070	< 12.5
2	0.118	16.9
3	0.050	< 12.5
4	0.030	< 12.5
5	0.060	< 12.5
6	0.050	< 12.5
7	0.076	< 12.5
8	0.025	< 12.5
9	0.040	< 12.5
10	0.065	< 12.5
11	0.044	< 12.5
12	0.037	< 12.5

Tabla 17. Valores para recta de calibrado en cloruro sódico 0.9%.

Concentración endotoxina *E. coli* pg/mL	Absorbancias, 405 nm n = 5					$\bar{A}$
12.5	0.042	0.054	0.063	0.051	0.040	0.050
25	0.113	0.111	0.114	0.088	0.099	0.105
50	0.232	0.219	0.203	0.223	0.198	0.215
75	0.304	0.312	0.359	0.284	0.366	0.325
100	0.441	0.410	0.423	0.396	0.430	0.440



r = 0.99 y = -0.44 + 4.25x

Figura 11. Recta de calibrado en cloruro sódico 0.9%. A, absorbancia a 405 nm; C, concentración de endotoxina en pg/mL.

Tabla 18. Muestras de cloruro sódico 0.9% sin contaminar

Muestra	Absorbancia 405 nm	Concentración endotoxina en pg/mL
1	0.018	< 12.5
2	0.016	< 12.5
3	0.008	< 12.5
4	0.034	< 12.5
5	0.060	16.2
6	0.055	14.3
7	0.076	18.7
8	0.105	25
9	0.020	< 12.5
10	0.009	< 12.5
11	0.016	< 12.5
12	0.031	< 12.5

- Bicarbonato sódico 8.4%

Estudio de inhibición.

LAL "Pyrogent".

Esta solución inyectable presenta problemas de inhibición de la reaccion LAL debido a su pH mayor de 8 (en las muestras analizadas 8.3), a su elevada concentración iónica y a su capacidad para quelar el ion calcio. Estos factores se estudian a continuación.

Influencia del pH. Siguiendo las instrucciones del método Pyrogent de Mallinckrodt y la USP XXI (1985), se ajustó el pH entre 6 y 7.5 con ClH 12 N. Se plantearon dos tipos de experiencias: A la mitad de las muestras a analizar se les añadió 0.1 mL de ClH en 9 mL de bicarbonato sódico 8.4% y a la otra mitad 0.6 mL de ClH.

Concentración iónica. Se sometieron al análisis muestras de bicarbonato sódico 8.4% sin diluir y diluidas con agua destilada apirógena 1/10.

Quelación o precipitación del calcio. El reactivo LAL Pyrogent utilizado contiene en cada vial de análisis único 0.14 mg de calcio. Este ión favorece la reacción de

gelificación. Asi gran cantidad de sustancias que inhiben la reacción de gelificación que se produce entre endotoxina y LAL, quelan el calcio. El bicarbonato sódico 8.4% forma con el calcio un precipitado de carbonato que es mucho menor con bicarbonato sódico 0.84% y que casi desaparece al añadir ClH. Este hecho puede explicar la menor inhibición de la reacción LAL-endotoxina con el bicarbonato sódico 0.84% y el pH más ácido.

Para estudiar la influencia de estos factores se diseñó el esquema experimental que se indica en las tablas 19 y 20. Se sometieron al análisis cualitativo Pyrogent las muestras de bicarbonato a las que se les había añadido endotoxina en la concentración que se indica. Se analizaron 4 muestras para cada tipo de dilución y 4 determinaciones por muestra.

Tabla 19. Estudio de la inhibición del LAL por bicarbonato sódico. Muestras sin diluir y diluidas; pH sin ajustar.

Concentración bicarbonato sódico	Endotoxina añadida pg/mL	pH	Resultado LAL
8.4%	100	8.30	-
0.84%	10	8.65	++
0.84%	100	8.65	++

\- Ausencia de gel
\+ Aumento ligero de viscosidad
++ Aumento notable de viscosidad
+++ Gel firme

Tabla 20. Estudio de la inhibición de la reacción LAL por bicarbonato sódico. Muestras con pH ajustado. Ver tabla 19.

Concentración bicarbonato sódico	Endotoxina añadida pg/mL	ClH añadido en mL	pH	Resultado LAL
8.4%	100	0.1	7,80	+
8.4%	100	0.6	6,65	++
0.84%	10	0.1	8,10	++
0.84%	100	0.6	7,80	++

Determinaciones en las muestras

LAL "Pyrogent"

Las ampollas de bicarbonato sódico 8.4% diluidas 1/10 y corregido el pH, dieron resultados negativos por el método cualitativo todas las muestras (ausencia de gel).

LAL "Coatest endotoxin"

Los resultados para la recta de calibrado en bicarbonato 0.84 % (figura 12) se indican en la tabla 21.

Las concentraciones de endotoxina determinadas para los inyectables sin previa contaminación se exponen en la tabla 22. Todos dieron valores menores de 12.5 pg/mL.

Tabla 21. Valores para la recta de calibrado en bicarbonato sódico 0.84%

Concentración endotoxina en pg/mL	Absorbancias, 405 nm n = 5					A
12.5	0.028	0.034	0.030	0.039	0.044	0.035
25	0.055	0.075	0.072	0.063	0.060	0.065
50	0.125	0.131	0.140	0.115	0.160	0.134
75	0.190	0.210	0.205	0.185	0.210	0.200
100	0.251	0.272	0.284	0.255	0.268	0.266

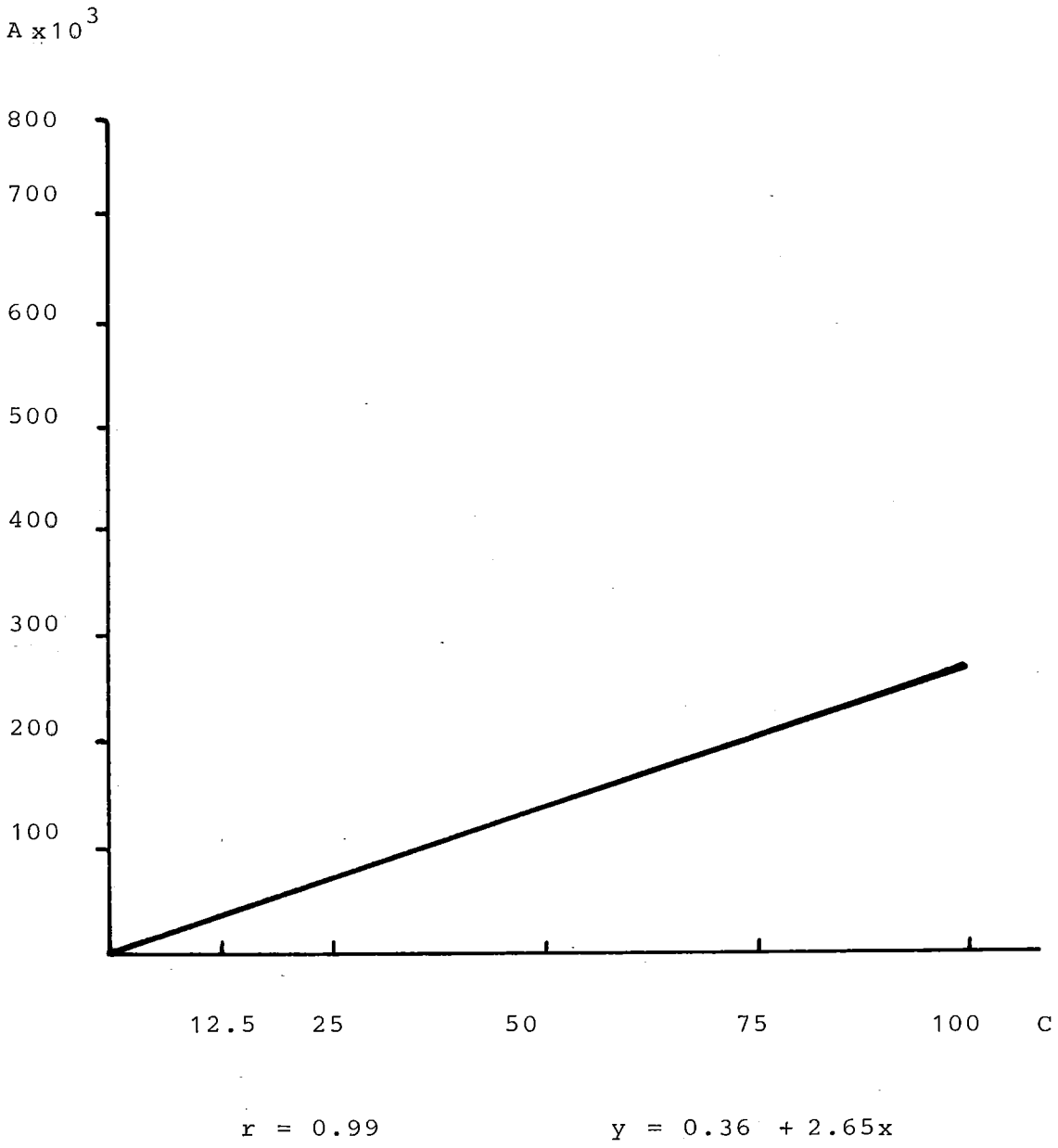


Figura 12. Recta de calibrado en bicarbonato sódico 0.84%. A, absorbancia a 405 nm; C, concentración de endotoxina en pg/mL.

Tabla 22. Concentraciones de endotoxina en las muestras de bicarbonato sódico 8.4%

Muestra (f = 10)	Absorbancia 405 nm	Concentracion endotoxina en pg/mL
1	0.024	< 12.5
2	0.037	< 12.5
3	0.027	< 12.5
4	0.024	< 12.5
5	0.025	< 12.5
6	0.033	< 12.5
7	0.010	< 12.5
8	0.017	< 12.5
9	0.026	< 12.5
10	0.015	< 12.5
11	0.029	< 12.5
12	0.026	< 12.5

f = factor de dilucion para evitar inhibición de la reacción LAL por bicarbonato sódico 8.4%.

b) Inyectables previamente contaminados con E. coli.

LAL "Pyrogent"

- Agua para inyección

No se produjo aumento de viscosidad ni formación de gel para las concentraciones teóricas de 10 y 100 gérmenes por mL. Se observó ligero aumento de viscosidad para 1000 y notable aumento para 10000 gérmenes por mL (tabla 23).

- Cloruro sódico 0.9%

Los resultados obtenidos en esta solución sin corregir el pH, como indican las instrucciones de la firma fabricante, fueron de aumento ligero de viscosidad para las concentraciones de 10.000 y 1.000 gérmenes/mL teóricos y negativos en las concentraciones 100 y 10 gérmenes/mL.

Por diferir estas observaciones de los resultados hallados para estas mismas muestras , con el método LAL "Coatest endotoxin" (elevadas concentraciones de endotoxina, tabla 26), se ajustó el pH de la solución a 7 y se repitieron los análisis; aumentó ligeramente la positividad para 10.000 y 1000 gérmenes por mL, sin variar los resultados en el resto de las diluciones (tabla 24).

Los ensayos realizados en paralelo con la endotoxina control E. coli 055:B5, produjeron resultados más positivos, con menor concentración de endotoxina, que los obtenidos en las soluciones contaminadas con E. coli hospitalario. Se expresan los resultados en UE/mL para que sean comparables por utilizar los dos reactivos diferentes endotoxinas de control (tabla 24).

- Bicarbonato sódico 8.4%

Las muestras de todas las diluciones de E. coli en bicarbonato sódico diluidas 1/10, dieron ausencia de gelificación (tabla 23).

Tabla 23: Resultados de agua para inyección y bicarbonato sódico 8.4% contaminados con E. coli, mediante método LAL "Pyrogent". Ver tabla 19.

Gérmenes/mL teóricos	Agua para inyección	Bicarbonato sódico 8.4% (f = 10)
10.000	++	-
1.000	+	-
100	-	-
10	-	-

Tabla 24. Gelificación del LAL "Pyrogent" por cloruro sódico 0.9% contaminado con distintas diluciones de E. coli hospitalario y con dos concentraciones de endotoxina E. coli 055:B5. Ver tabla 19.

Contaminación	Gérmenes/mL	UE/mL	pH	
			5.5	7
Endotoxina E. coli 055:B5		1	+++	+++
		0.5	++	+++
E. coli	10.000	540	+	++
	1.000	31.7	+	+
	100	5.2	-	-
	10	0.3	-	-

LAL "Coatest endotoxin"

- Agua para inyección.

  En la tabla 25 se indican las concentraciones de endotoxina halladas en agua para inyección previamente contaminada.

- Cloruro sódico 0.9%

  Los resultados de las concentraciones de endotoxina obtenidas para las diferentes diluciones de E. coli en cloruro sódico 0.9% sometidas después a esterilización se indican en la tabla 26. Fue preciso diluir las muestras para determinación de las concentraciones de endotoxina con el factor f que que se expone en la tabla para conseguir niveles de endotoxina dentro de los límites del método de sustrato cromogénico. Las concentraciones obtenidas se multiplicaron por el correspondiente factor de dilución al que se habían sometido.

- Bicarbonato sódico 8.4%

  Las concentraciones de endotoxina en pg/mL halladas para las diferentes diluciones se exponen en la tabla 27.

Tabla 25: Resultados de agua para inyección contaminada previamente con E. coli, mediante método LAL "Coatest endotoxin"

Número colonias		Absorbancia	Concentración endotoxina
Teóricos	Viables	405 nm	pg/mL
10	0	0.127	15.5
		0.120	14.5
		0.092	12.5
100	1	0.147	17.5
		0.156	18.5
		0.178	22
1000	7	0.185	25
		0.194	25.5
		0.193	25.2
10000	15	0.214	26.5
		0.200	26
		0.207	26.3

Tabla 26: Resultados con cloruro sódico 0.9% contaminado-previamente con E. coli mediante método LAL "Coatest endotoxin"

Número colonias		Absorbancia	Concentración
		405 nm	endotoxina
Teórico	Viables		pg/ml
10	4	0.115	25.5
		0.105	25
		0.109	25.2
100	50	0.184	42
		0.180	41.5
(f = 10)		0.190	42.5
1000	484	0.118	25.7
		0.113	25.3
(f = 100)		0.110	25.1
10000	5187	0.190	42.5
(f = 1000)		0.186	42.2
		0.195	45

f = Factor de dilución necesario para alcanzar niveles de endotoxina problema dentro de los valores de la recta de calibrado que indica la técnica.

Tabla 27: Resultados bicarbonato sódico 8.4% contaminado previamente con E. coli, mediante método LAL "Coatest endotoxin"

Número colonias		Absorbancia	Concentración de endotoxina
Teóricas	Viables	405 nm	pg/mL
10	0	0.005	< 12.5
		0.003	< 12.5
(f=10)		0.010	< 12.5
100	0	0.012	< 12.5
		0.015	< 12.5
(f=10)		0.007	< 12.5
1000	1	0.011	< 12.5
		0.015	< 12.5
(f=10)		0.008	< 12.5
10000	4	0.012	< 12.5
		0.013	< 12.5
(f=10)		0.020	< 12.5

f = factor de dilución de 10 para todas las muestras para evitar la inhibición de la reacción LAL por el bicarbonato sódico 8.4%

3. Análisis en conejos

Interpretación del análisis (USP XXI, 1985, p 1181)

Se consideró cualquier disminución de temperatura como aumento cero. Si ningun conejo mostró un aumento individual de temperatura de 0.6 ° o más por encima de su temperatura control respectiva, y si la suma de los tres incrementos máximos de temperatura individuales no sobrepasó 1.4°, el producto reunía los requisitos para ausencia de pirógenos.

Si cualquier conejo mostró un aumento de temperatura individual de 0.6° o más , o si la suma de los tres incrementos máximos de temperatura individuales excedió 1.4° , se continuaba el análisis utilizando otros 5 conejos.

Si no más de 3 de los 8 conejos mostraron aumentos individuales de temperatura de 0.6° o más y si la suma de los 8 incrementos máximos individuales de temperatura no excedió 3.7° , el material a examinar reunía los requisitos para ausencia de pirógenos.

a) Inyectables no contaminados

En las figuras 13, 14 y 15 se exponen las gráficas de temperatura rectal obtenidas en conejos despues de la inyección de las ampollas sin contaminar. Han sido curvas que indican ausencia de pirógenos.

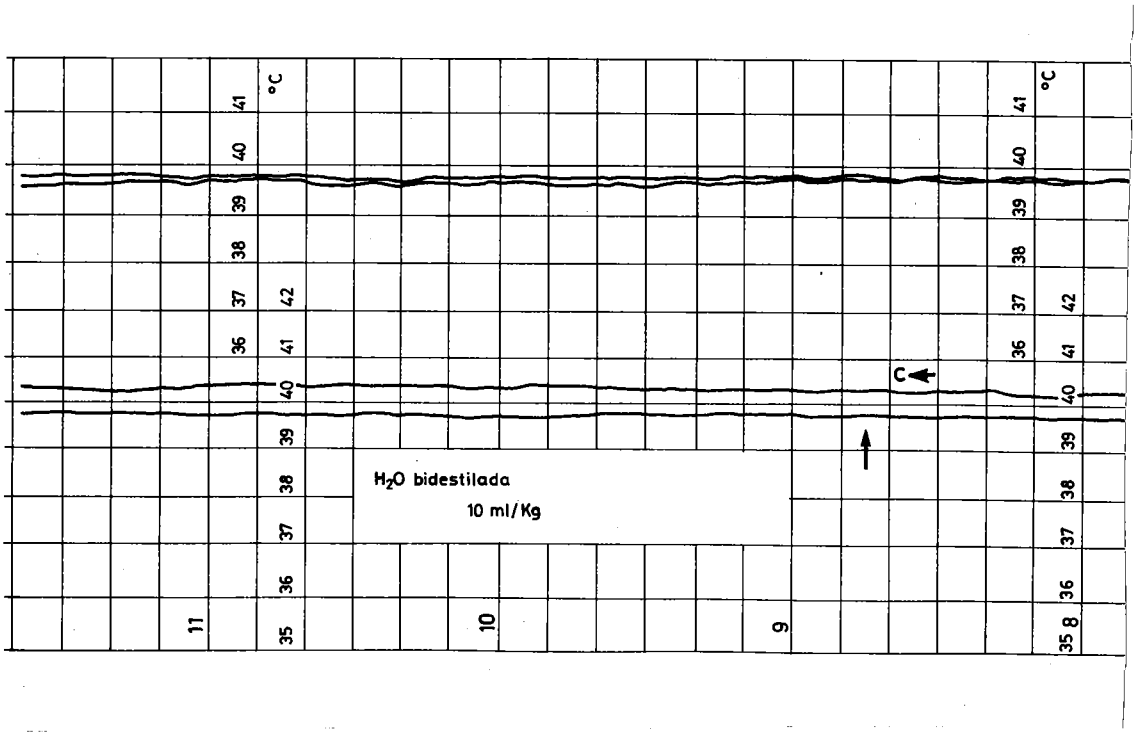


Figura 13. Ensayo de pirógenos en conejo. C → , conejo control; dirección de avance del registro, de izquierda a derecha; números en lineas horizontales, horas y minutos; números en lineas verticales, temperaturas; ↓ momento de la inyección.

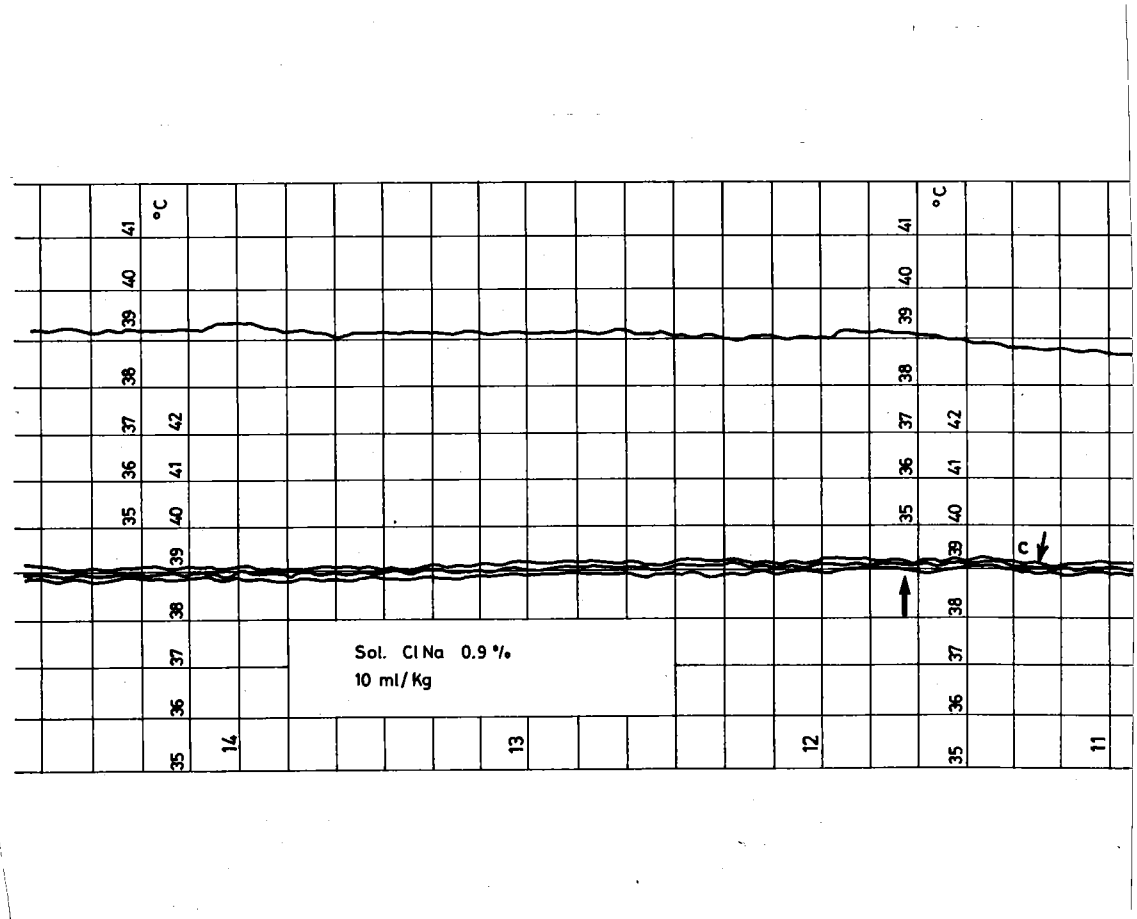


Figura 14. Ver figura 13.

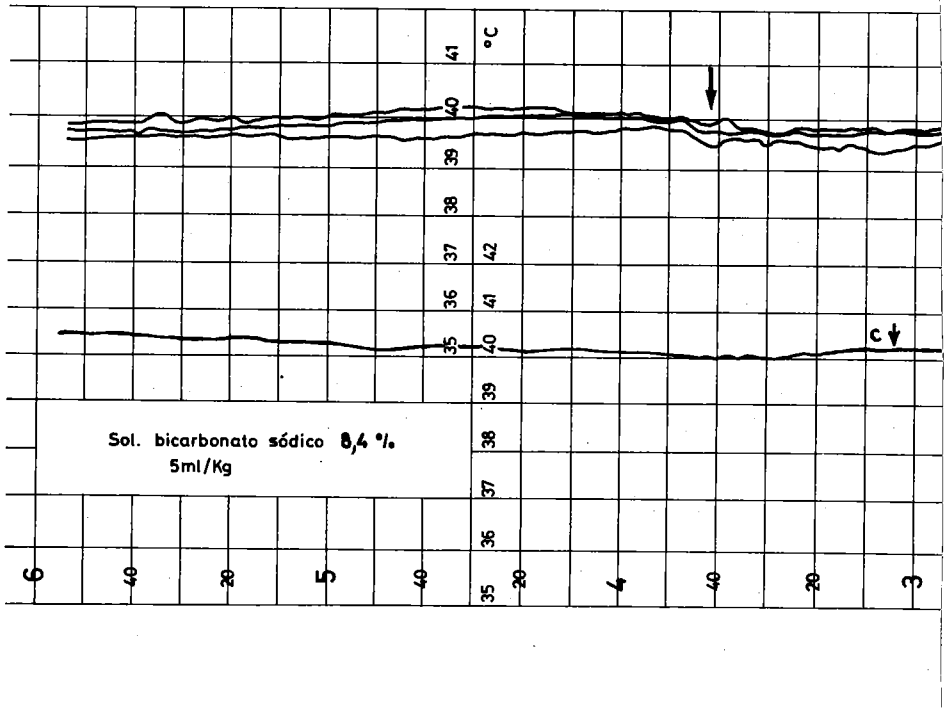


Figura 15. Ver figura 13.

b) Soluciones contaminadas con E. coli.

Los incrementos de temperatura en conejos después del análisis fueron nulos o bajos para todas las diluciones de E. coli en agua para inyección con 10, 100 y 1.000 gérmenes por mL (tabla 28, figuras 16 y 17). La dilución de 10.000 gérmenes por mL produjo análisis positivos después de la repetición con 5 conejos más (tabla 29).

El inyectable de cloruro sódico 0.9% con 10 colonias/mL, dió incrementos máximos cuya suma excedió 1.4° . Se continuó el análisis con otros 5 conejos; la suma de los 8 incrementos máximos de temperatura fué mayor de 3.7° , y por tanto resultado positivo (tabla 30 y figura 18). Las diluciones de E. coli en cloruro sódico 0.9% de 100, 1000 y 10000 colonias/mL anteriores a la esterilización con importantes concentraciones de endotoxina determinadas por LAL "Coatest endotoxin", no se analizaron en conejos para evitar pérdidas de animales.

Todas las diluciones de E. coli en bicarbonato sódico 8.4% dieron resultados en conejos positivos (tablas 31 y 32, figura 19).

Tabla 28. Resultados análisis en conejos de agua para inyección previamente contaminada con E. coli (Δ temperatura en°)

Número colonias/mL	Conejos	Δ Temperatura 1 h	2 h	3 h
10	1	0	0	0
	2	0	0	0.1
	3	0.2	0	0
100	1	0	0.1	0
	2	0.1	0.3	0.2
	3	0.1	0.2	0.2
1000	1	0.3	0.3	0.4
	2	0	0.2	0.2
	3	0	0	0.1

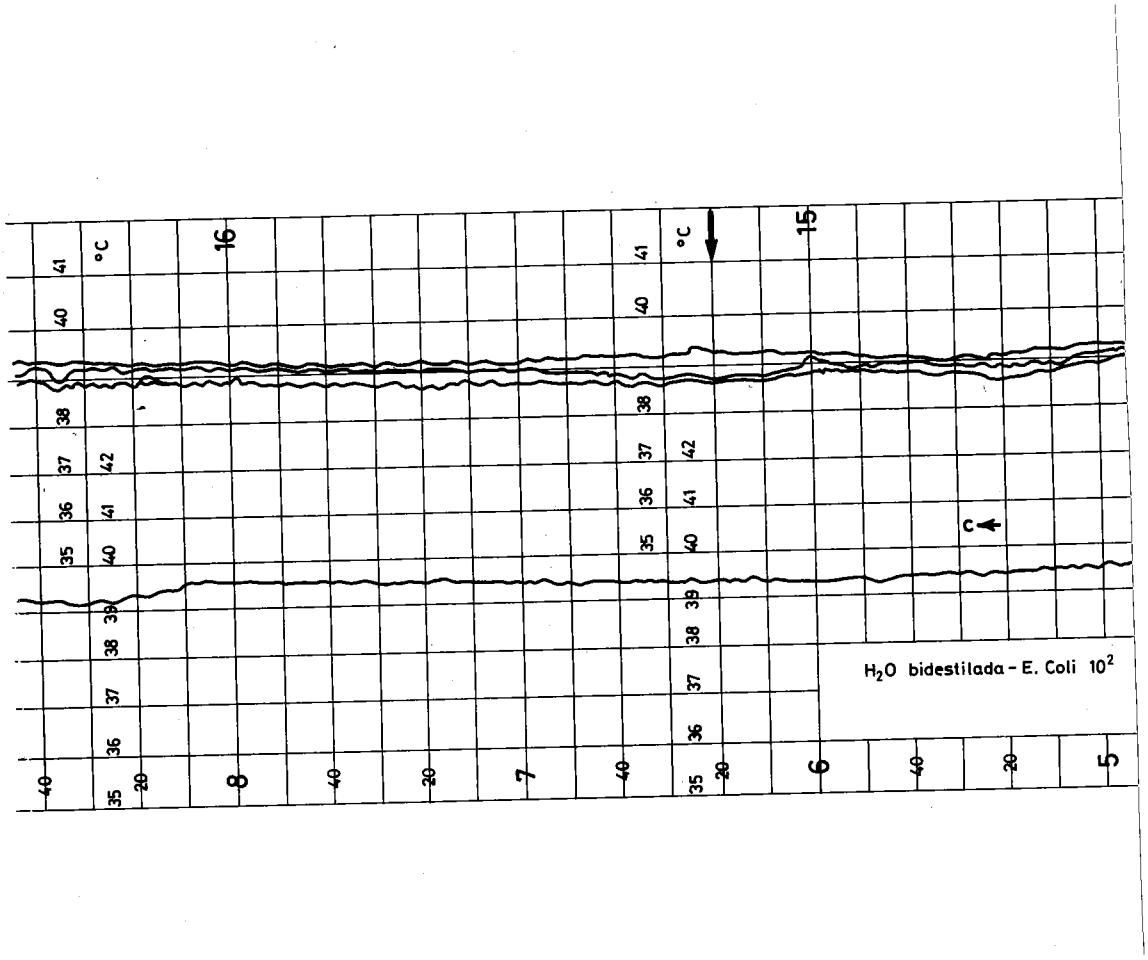


Figura 16. Ver figura 13.

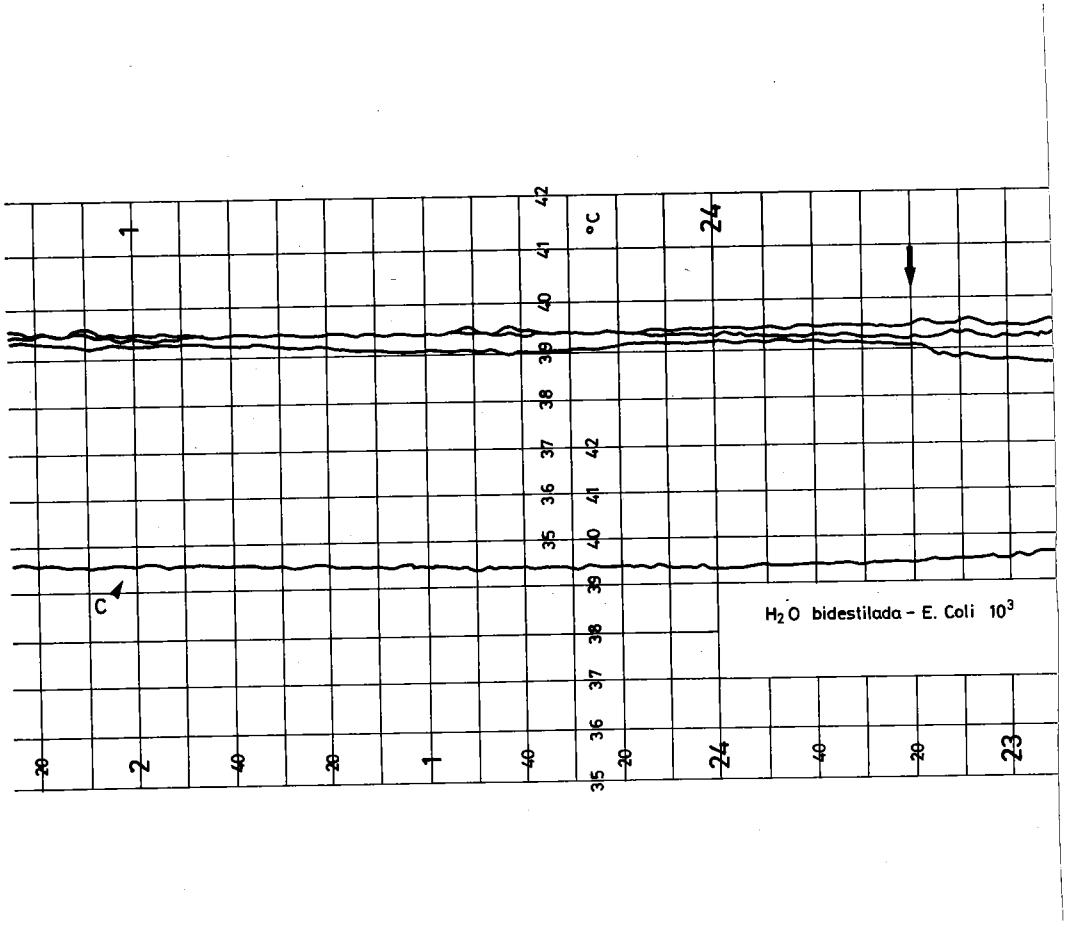


Figura 17. Ver figura 13.

Tabla 29. Resultados análisis en conejos de agua para inyección, dilución de 10.000 gérmenes/mL de E. coli (Δ temperatura en °).

Conejos	Δ Temperatura		
	1 h	2 h	3 h
1	0.4	0.4	0.4
2	0.6	1.2	1.4
3	0.4	0.6	0.7
4	0.4	0.4	0.5
5	0.6	1.1	1.1
6	0.4	0.6	0.6
7	0.5	1.1	1.2
8	0.2	0.4	0.4

Tabla 30. Resultados análisis en conejos de cloruro sódico 0.9% previamente contaminado con E. coli (Δ temperatura en°).

Número colonias/mL	Conejos	Δ Temperatura 1 h	2 h	3 h
	1	0.4	1.7	1.7
10	2	1	1.4	1.2
	3	1.3	1.7	1.9
	4	0.4	1	1.4
	5	0.3	0.9	0.9
	6	0.9	1.2	1.5
	7	0.8	1.3	1.9
	8	1.1	1.7	2

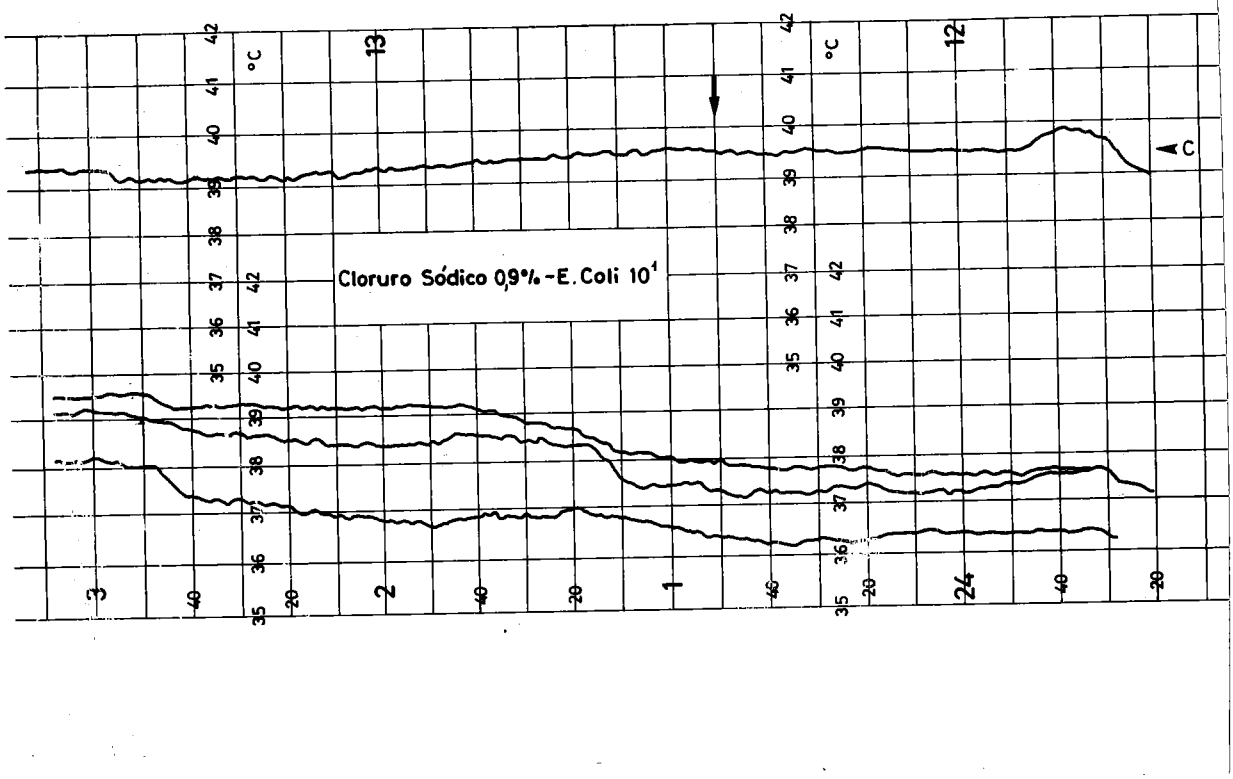


Figura 18. Ver figura 13.

Tabla 31. Resultados análisis en conejos de bicarbonato sódico 8.4% previamente contaminado con E. coli (Δ temperatura en °)

Número colonias/mL	Conejos	Δ Temperatura 1 h	2 h	3 h
10	1	0.8	0.8	1.2
	2	0.7	0.4	1
	3	0	0.4	0.9
	4	0.5	0.7	1
	5	0.3	0.6	1.1
	6	0.7	0.8	0.9
	7	0.6	0.9	1.2
	8	0.4	0.6	0.9
100	1	0.4	1	1.2
	2	0.6	1.2	1.6
	3	0.4	1.1	1.8
	4	0.3	0.9	1.2
	5	0.4	1	1.6
	6	0.5	1.1	1.7
	7	0.3	0.8	1.1
	8	0.3	0.6	1

Tabla 32. Resultados análisis en conejos de bicarbonato sódico 8.4% previamente contaminado con E. coli (Δ temperatura en°)

Número colonias/mL	Conejos	Δ Temperatura 1 h	2 h	3 h
1.000	1	0.5	0.8	1.2
	2	0.4	0.7	1.4
	3	0.6	0.9	1.5
	4	0.7	1	1.6
	5	0.5	0.8	1.3
	6	0.6	1.5	1.7
	7	0.7	1.4	1.5
	8	0.5	1	1.3
10.000	1	0.7	0.2	0.5
	2	0.8	0.8	0.8
	3	0.9	1.2	1.6
	4	0.6	1	1.3
	5	0.7	0.9	1.2
	6	0.5	1.1	1.1
	7	0.8	1	1.3
	8	0.9	1.2	1.4

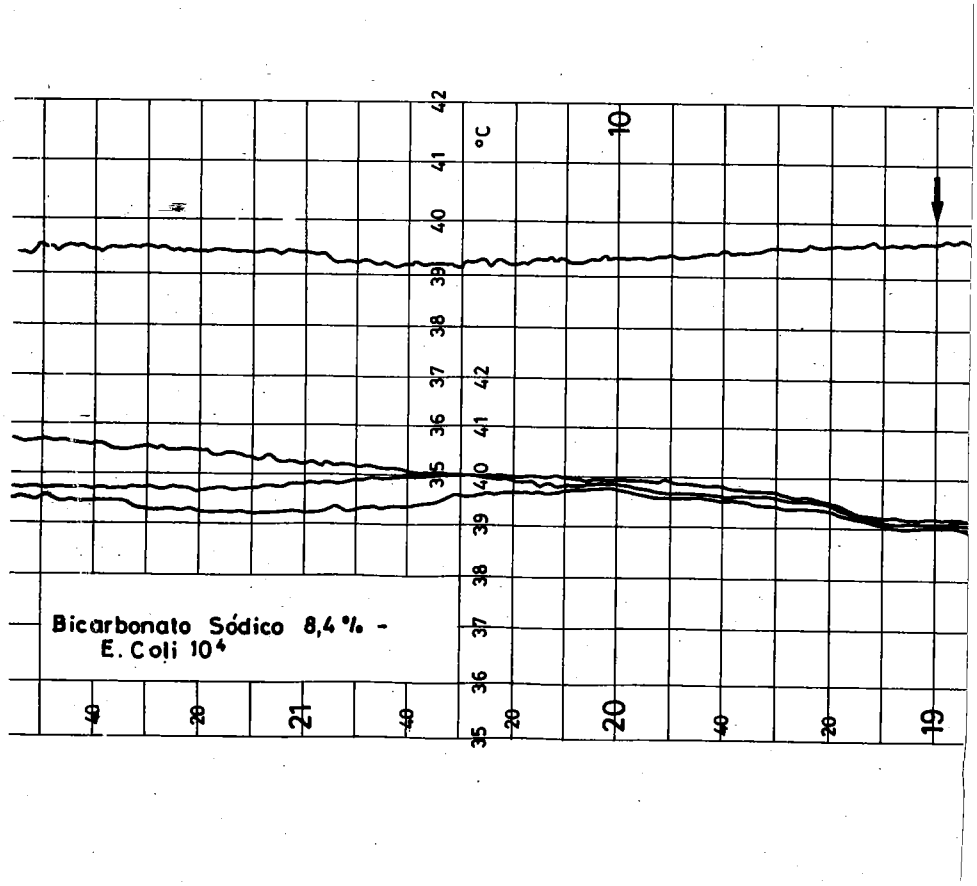


Figura 19. Ver figura 13.

c) Resultados en conejos de la inyección de 10 ng/kg de endotoxina E. coli 055:B5

Se verificó que la colonia de conejos en la que se realizaron los análisis daba respuestas pirogénicas positivas a la inyección de 10 ng/kg de endotoxina estandar E. coli 055:B5.

La suma de los incrementos de temperatura máximos resultó 10.4 °, mayor de 3.7° y por tanto pirogénica (tabla 33 y figura 20)

Tabla 33. Resultados en conejos de la inyección de 10 ng/kg de endotoxina E. coli 055:B5 (Δ temperatura en °)

Conejos	1a h	2a h	3a h
1	0.9	1	0.9
2	0.7	0.5	0.5
3	0.9	1.4	1.3
4	1	1.5	2
5	0.9	1.2	1.9
6	1.1	1.3	1.6
7	0.8	1.1	1.4
8	0.9	1	1.1

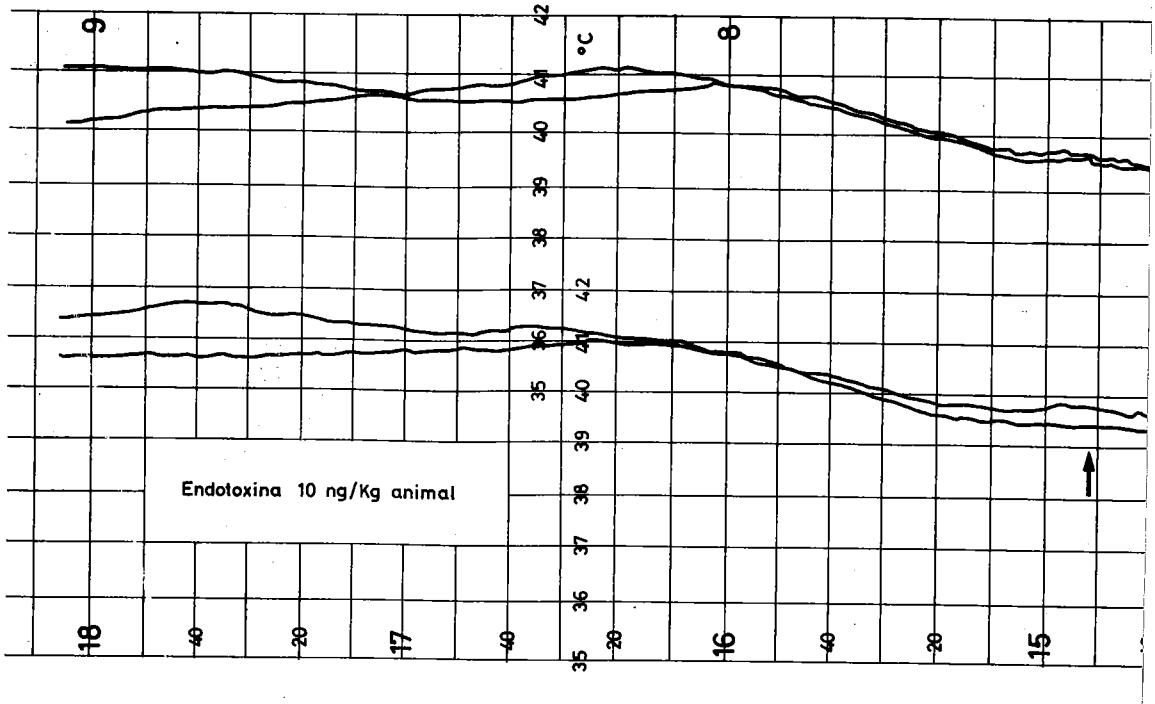


Figura 20. Ver figura 13.

4. Método de agregación plaquetaria por la endotoxina.

a) Agregación en plasma rico en plaquetas (lumiagregómetro):

Estudio de sensibilidad.

El ADP 5 μM produce a los 10 minutos una agregación de 59% (figura 21).

Actividad de endotoxina.

- 2.5 μg de endotoxina no produjeron agregación.

- 12.5 μg de endotoxina no produjeron agregación plaquetaria en PRP.

- 25 μg de endotoxina no produjeron agregación (vease figura 22).

- La adición de ADP en cubeta de experimentación si produce agregación del 55% que demuestra las buenas condiciones de la capacidad agregante del PRP en estudio.

Figura 21. Agregación en PRP por ADP 5 μM.

Figura 22. Agregación en PRP. Efecto de 25 µg de endotoxina y ADP 5 µM.

b) Estudio en sangre completa.

Se estudiaron tres muestras de sangre A, B y C.

Sangre A:

Estudio de sensibilidad.

El ADP 5 μM produce una agregación máxima de 69% en 5 minutos (figura 23).

Actividad de endotoxina.

- 1 μg de endotoxina no modifica el trayecto de la linea base.

- 2.5 μg de endotoxina modifica en 10 minutos el trayecto de la linea base en un 28 %. El ADP 5 μM produjo una caida del 72% a partir de la agregación inicial producida por los 2.5 μg de endotoxina (figura 24).

- 12.5 μg de endotoxina produce un suave descenso de la linea base (agregacion) que en 10 minutos es del 37% (figura 25).

- 25 μg de endotoxina produce una agregación de 93% en 8 minutos.

Figura 23. Agregación en sangre total A por ADP 5 μM.

Figura 24. Agregación en sangre total A. Efecto de 2.5 µg de endotoxina y ADP 5 µM.

Figura 25. Agregación en sangre total A. Efecto de 12.5 µg de endotoxina y ADP 5 µM.

Sangre B:

Estudio de sensibilidad.

El ADP 5 μM produce una agregación máxima del 90%.

Actividad de endotoxina.

- 2.5 μg de endotoxina no modificaron la agregación.

- 12.5 μg de endotoxina no modificaron la agregación.

- 25 μg de endotoxina produjo una desviación de la linea base del 48% (figura 26).

Sangre C:

Estudio de sensibilidad.

El ADP 5 μM produce una agregación máxima del 48%.

Actividad de endotoxina.

- La adición de 2.5 μg de endotoxina no modifica la agregación.

- La adición de 12.5 μg de endotoxina produce un suave descenso del 10%.

- La adición de 25 μg de endotoxina modifica la agregación en un 25%.

Figura 26. Agregación en sangre total B. Efecto de 25 µg de endotoxina.

IV. DISCUSION

1. Preparación de los inyectables

Los inyectables de pequeño volumen en farmacia de hospital deben prepararse en un laboratorio con instalaciones adecuadas de acuerdo con las normas de buena práctica de fabricación. Se plantean tres posibles contaminaciones pirogénicas:

- Contaminación bacteriana anterior a la esterilización. Puede evitarse con un correcto control en proceso (Lafuente y Hércules, 1986).

- Contaminación por endotoxina en el inyectable terminado. Es improbable si se ha evitado la anterior.

- Otros productos pirogénicos. Los años de experiencia en el control en proceso de productos parenterales y la vigilancia de las autoridades han demostrado que la posible contaminación pirogénica diferente de la endotoxina no es significativa (Cooper, 1985).

La solución para evitar estos problemas debe resolverla cada laboratorio u hospital. Incluye normas de limpieza para evitar la contaminación microbiana y un estricto control en proceso con análisis microbiológico y LAL.

La instalación donde se preparan los inyectables debe ser sencilla y eficiente. En la figura 27 se indica un esquema de la zona de preparación de inyectables. Se aplicó un programa de limpieza y control con sistemas de filtración de aire desinfección como en quirófano. El aparato de filtración y los tubos metálicos que estaban en contacto con la solución inyectable fueron esterilizados en autoclave. El material de vidrio en el que se realizó la disolución se había esterilizado por calor seco a 250°, 30 min y controlado por LAL (USP XXI, p 1343), para verificar la ausencia de endotoxina en el mismo.

Se realizaron controles microbiológicos en los puntos 1, 2, 3 y 4 (figura 27). Un primer lote de inyectables dió resultados

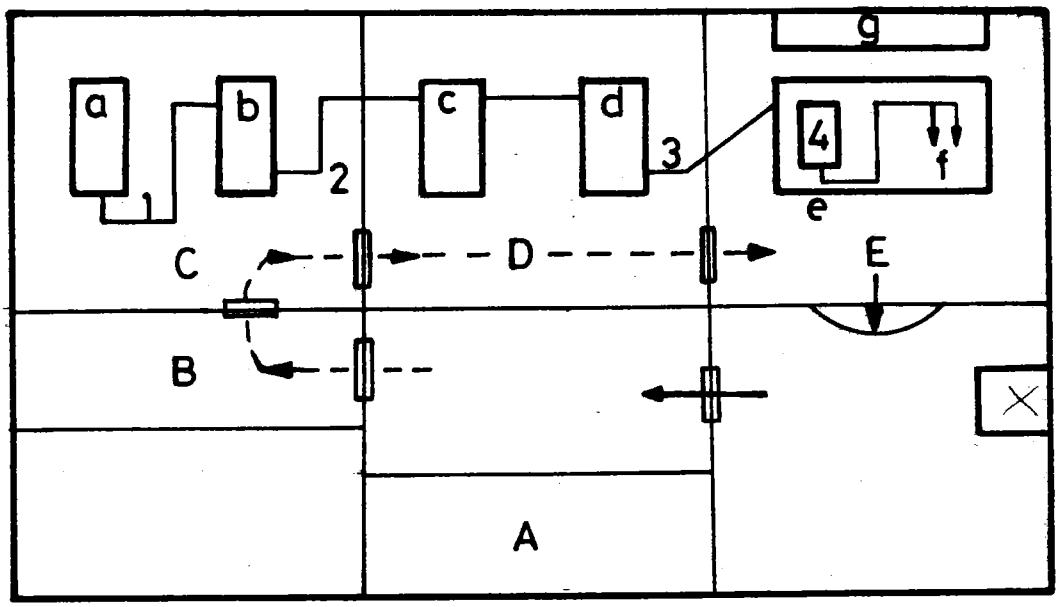


Figura 27. Esquema de la zona de preparación de inyectables

Zona A. Desembalado y lavado de ampollas

Zona B. Esterilización por calor seco y óxido de etileno

Zona C. a. Columna desionizadora

b. Destilador

Zona D. c. Disolución

d. Filtración

Zona E. e. Llenado

f. Cierre

g. Flujo laminar

1, 2, 3, 4 puntos de control

x. Autoclave

negativos en los puntos 1, 2 y 3. Sin embargo los recuentos a la salida de la máquina de llenado y cerrado de inyectables (zona E) fueron de 100-1000 gérmenes/mL.

Se esterilizaron por óxido de etileno los tubos de silicona de la máquina. Una válvula que controla el llenado (punto 4), que no se esterilizaba fué, el último punto de contaminación. Se pasaban a través de ella 500 mL de hipoclorito sódico 1000 ppm y 3000 mL de agua para inyección; se consiguieron recuentos a la salida de la máquina menores de 50 gérmenes/mL. A partir de los resultados de los controles iniciales, se aplicó este protocolo de desinfección de los aparatos en contacto con la solución inyectable y se fabricaron los tres lotes de inyectables no contaminados.

Para disminuir todavía más la carga bacteriana (hasta 1 gérmen en 100 mL) puede realizarse, antes de iniciar la fabricación diariamente, un lavado con detergente clorado en 200 ppm y después pasar agua para inyección a 80-100° , 20 minutos (Lafuente, 1986).

USP XXI p 1353 considera que los recuentos microbianos de gérmenes aerobios en agua para inyección pueden ser de hasta 50 gérmenes/mL y que si se aproximan o exceden a ese valor, es preciso tomar medidas correctoras como cloración, filtración, radiacion etc.

La instalación puede mejorarse para evitar la contaminación con mamparas de aluminio selladas con plástico, cierre hermético de las puertas, sobrepresión en el lugar de llenado, evitar angulos, techo plastificado y lavable. Debe mantenerse el cierre con especial cuidado en E. Puede instalarse sobrepresión E/D de 4 mm de agua, con entrada de aire filtrado.

2. Análisis microbiológico

a. Inyectables no contaminados

En el agua para inyección los recuentos fueron menores de 10 gérmenes por mL y en el cloruro sódico 0.9% menores de 100 (tablas 12 y 13). Fueron superiores en las muestras del comienzo de los lotes ya que la solución inyectable iba arrastrando los gérmenes que quedaban en el punto de contaminación.

Los resultados en el inyectable de bicarbonato sódico 8.4% fueron negativos excepto en una placa de aerobios que dió una colonia (en una muestra de 10 mL). En los cultivos anaerobios y de hongos y levaduras los resultados fueron ausencia de crecimiento para los tres inyectables.

El resultado negativo final en conejos y LAL, indica que

estos bajos recuentos anteriores a la esterilización no producían contaminación pirogénica en el producto terminado (conejos negativo, LAL negativo). El análisis microbiológico fue útil para mejorar las técnicas de fabricacion y la calidad pirogénica de los inyectables.

Por tanto con el mismo procedimiento de fabricación, el cloruro sódico 0.9%, que es un medio más adecuado de crecimiento bacteriano, da recuentos mayores; disminuyen en agua para inyección por ser un medio no isotónico y resultan prácticamente negativos en el bicarbonato sódico 8.4% que por su elevada concentración iónica y su alto pH es un medio dificil para la multiplicación de los gérmenes.

Estas observaciones hay que tenerlas en cuenta en la fabricación de formas farmacéuticas parenterales para extremar el control en proceso en aquellas soluciones más susceptibles de crecimiento bacteriano.

Greppin y Nguyen (1973) y Marcus (1964) observaron que para recuentos bacterianos menores de 1000 gérmenes viables por mL, el análisis de pirogenos era negativo en conejos, después de la esterilización de la solución y si damos un factor de seguridad de 100, 10 gérmenes viables por mL o menos asegura la calidad.

Pero no sólo el número de bacterias es un índice del nivel pirogénico posterior a la esterilización sino también el tipo de germen identificado. Como indicaba Dony (1979) los pirógenos son sobre todo endotoxinas de los gérmenes Gram negativos y determinados géneros y especies son más pirogénicos que otros.

En nuestro caso han sido bacilos Gram negativos no fermentadores (Pseudomonas putida fluorescens) y cocos Gram positivos (Staphylococcus coagulasa negativo), que en los análisis de pirógenos posteriores a la esterilización dieron resultados negativos en conejos y concentraciones de endotoxina menores de 25 pg/mL.

Hay que señalar como Pearson et al (1982) y Weary (1986) que las endotoxinas de gérmenes que se aislan corrientemente en las plantas de fabricación producen menos hipertermia en conejos que las endotoxinas estandar utilizadas como referencia; lo cual coincide con nuestros resultados observados sobre todo en el cloruro sódico 0.9% que da recuentos mayores y sin embargo resultados negativos en los ensayos en conejos y LAL.

b. Inyectables contaminados.

Los recuentos fueron de 0 a 15 gérmenes por mL en agua para inyección, de 0 a 6 en bicarbonato sódico 8.4% y de 4 a 5187 en cloruro sódico 0.9% (tabla 14). Por tanto como en los inyectables no contaminados se repite la observación de que el crecimiento bacteriano es mayor en cloruro sódico 0.9%.

3. Análisis LAL

a. Inyectables no contaminados

LAL "Pyrogent". Los resultados fueron negativos en todas las muestras.

LAL "Coatest endotoxin". En agua para inyección las concentraciones de endotoxina fueron menores de 12.5 pg/mL excepto una muestra que dió 16.9 pg/mL (tabla 16); en cloruro sódico 0.9% ocho muestras contenían menos de 12.5 pg/mL y las otras cuatro estaban entre 14.3 y 25 pg/mL (tabla 18); en bicarbonato sódico 8.4% todas fueron menores de 12.5 pg/mL (tabla 22).

b. Inyectables contaminados

- LAL "Pyrogent"

El agua para inyeccion dió aumento notable de viscosidad en la dilución de 10.000 gérmenes/mL; ligero aumento en la de 1.000 y resultado negativo en el resto (tabla 23). Estos resultados fueron concordantes con los obtenidos en conejos (tablas 28 y 29) y en LAL "Coatest endotoxin" en el que la concentración media obtenida para el recuento bacteriano mayor fué de 26.2 pg/mL (tabla 25).

El ensayo en cloruro sódico 0.9% (tabla 24), a pH 7, resultó similar que en agua para inyección; a pH 5.5 solo aumentó ligeramente la viscosidad la dilución de 10.000 gérmenes/mL. Este resultado no concuerda con los recuentos microbiológicos (tabla 14), el ensayo en conejos (tabla 30) y las elevadas concentraciones obtenidas con LAL "Coatest endotoxin", (tabla 26); puede concluirse por tanto que el método LAL "Pyrogent" no es válido para este inyectable. Munson (1985) señalaba que la reacción de gelificación era inhibida, en algunos métodos LAL, por cloruro sódico 0.9%, lo cual coincide con nuestros resultados en LAL "Pyrogent".

Todas las muestras de bicarbonato sódico 8.4% diluidas 1/10 dieron resultados negativos con este método y con LAL "Coatest endotoxin" (tabla 27); en conejos (tablas 31 y 32) los resultados fueron positivos.

Hemos observado, como Hochstein (1985), que el método basado en la presencia o ausencia de gel firme, se interpreta de forma más subjetiva y menos cuantitativa que el método LAL con sustrato cromogénico. Levin (1985) indicaba que los resultados que no son gel firme, sino floculación y aumento de viscosidad pueden considerarse positivos; esto aumenta la sensibilidad del análisis, si los controles negativos son correctos, pero en nuestra experiencia consideramos que dicha interpretación sería menos definitiva y nos ha obligado a definir tres grados de positividad (tabla 19).

- LAL "Coatest endotoxin"

En agua para inyección la concentración de endotoxina determinada fué de 12.5 a 26.5 pg/mL (tabla 25).

En el caso del cloruro sódico 0.9% se presentó una progresión de 25 a 45.000 pg/mL, estimada por extrapolación, de acuerdo con el recuento de gérmenes viables anterior a la esterilización, de 4 a 5187 (tabla 14)

Las muestras de bicarbonato sódico 8.4% resultaron con concentraciones de endotoxina menores de 12.5 pg/mL (tabla 25). Como en conejos dieron resultados positivos, podemos considerar que este inyectable, incluso diluido 1/10, inhibe la reacción de gelificación; estas observaciones difieren de las de Fussellier et al (1977) que consideraban el método LAL como válido para este inyectable. Nuestros datos indican que no puede utilizarse.

c. Inhibición de LAL por el bicarbonato sódico 8.4%

Muestras con pH sin ajustar. Se observa (tabla 19) que las muestras sin diluir, con 100 pg/mL de endotoxina estandar y pH sin ajustar dieron resultados negativos, lo que indica inhibición de la reacción de la endotoxina con LAL. Si se añadía la endotoxina en concentraciones de 10 y 100 pg/mL a la muestra diluida (bicarbonato sódico 0.84%), los resultados eran positivos; por lo tanto no inhibía la reacción.

Muestras con pH ajustado. En las muestras no diluidas las de pH 7.80 dieron resultados menos positivos que las de pH

6.65, con concentración de endotoxina de 100 pg/mL. Las muestras diluidas dieron todas resultados positivos aún con la concentración de endotoxina de 10 pg/mL independientemente del pH (tabla 20).

Storck (1979) señaló que el ión calcio se añade al reactivo LAL para que favorezca la reacción de gelificación y tenga una mayor sensibilidad. Observó inhibición en heparina sódica pero no en heparina cálcica. Gran cantidad de sustancias que inhiben la reacción de gelificación, quelan el calcio. Así Murata et al (1976) comunicaban la inbición por el fosfato sódico (^{32}P) y el fitato (^{99}Tc); Sullivan y Watson (1975) la inhibición por la heparina sódica; Van Noordwijk y de Jong (1977) por la tetraciclina y la oxitetraciclina; Fussellier et al (1983) por las soluciones de citratos y fosfatos.

El bicarbonato sódico con el calcio forma un precipitado de carbonato (dependiente de su concentración y del pH). Cuando las muestras se someten a dilución o si se disminuye el pH, precipita menos el calcio presente en el reactivo y por ello la reacción no se inhibe.

En experiencias adicionales comprobamos que cuando se añadía cloruro cálcico en la misma concentración que la contenida

en el reactivo a las muestras de bicarbonato sódico 8.4% se formaba un precipitado abundante y claro. Sin embargo cuando esta misma cantidad se adiciona a las muestras con bicarbonato sódico 0,84%, aparece una ligerísima turbidez. Al adicionar 0,6 mL de ClH, a las muestras anteriores, el precipitado se disuelve. La disolución es menor cuando solo se añaden 0,1 mL. Estas observaciones pueden confirmar todos los resultados expuestos.

A pesar de que el estudio de inhibición, realizado con endotoxina estandar, indica que se evita la inhibición con la dilución y el ajuste de pH, los resultados negativos con LAL y positivos en conejos del bicarbonato sódico 8.4% contaminado sugieren que el método LAL no es válido para este inyectable.

d. Límites de endotoxina

Cooper (1985) señalaba que el acuerdo entre FDA e industria farmacéutica consideraba el límite de concentración de endotoxina para los inyectables en 5 UE/kg (400 pg/kg de la

endotoxina 011:B4) que es la dosis umbral pirogénica en conejo.

En los inyectables de agua para inyección y cloruro sódico 0.9% con una dosis en conejo de 10 mL/kg, la concentración máxima permitida sería 40 pg/mL. Los inyectables no contaminados analizados están por debajo de estos límites. Los inyectables contaminados con E. coli hospitalario, sin embargo, aunque las diluciones de 10 gérmenes/mL en cloruro sódico 0.9% y de 10.000 gérmenes/mL en agua para inyección (tablas 25 y 26), contienen menos de 40 pg/mL, han producido resultados positivos en conejos. Esto puede sugerir que los límites de endotoxina establecidos por las autoridades, deben referirse a la endotoxina que pueda producirse en una planta de fabricación; no a una contaminación con una endotoxina estandar o con un bacteria Gram negativa seleccionada como en nuestra experiencia.

Pearson (1985) observó que concentraciones de endotoxina ambiental diez veces superiores a 5 UE/kg no producían respuesta pirogénica en conejo y que por tanto con ese límite de endotoxina se trabaja con un factor de seguridad de diez. Esta observación coincide con nuestros resultados si comparamos inyectables contaminados y no contaminados;

para concentraciones de endotoxina similares (tablas 18 y 26) los resultados en conejos fueron negativos en los inyectables no contaminados y positivos en los contaminados).

e. Aplicación del análisis LAL en farmacia de hospital

El ensayo en conejos precisa un estabulario y personal para su mantenimiento, condiciones dificiles de tener en una farmacia de hospital. El análisis LAL es más sencillo y menos costoso cuando se ha validado para un determinado medicamento. Puede ser una alternativa adecuada al método en conejos si se realiza también un correcto control microbiológico durante el proceso de fabricación.

La utilización de la técnica LAL en el servicio de farmacia, ha dado la posibilidad de realizar análisis de soluciones parenterales de gran volumen, preparadas por la industria farmacéutica, de las que se sospechaba habían dado reacciones pirogénicas. Se ha podido dar una respuesta basada en un análisis sencillo.

La vía de administración intratecal, utilizada sobre todo a nivel hospitalario, es especialmente sensible a la endotoxina y pueden producirse meningitis asépticas cuando

por esa vía (Cooper, 1977). De hecho la FDA (1983) estableció la concentración de endotoxina máxima por esta vía en 0.2 UE/mL (25 veces menos que para los medicamentos de uso parenteral). Se ha producido recientemente una contaminación por endotoxina en un inyectable para anestesia epidural que ha producido casos de meningitis aséptica en varios hospitales y aunque los análisis en conejos daban resultados negativos (Rodriguez-Sasiain, 1986), detectamos en nuestro laboratorio por LAL "Pyrogent" elevadas concentraciones de endotoxina. Por tanto el ensayo LAL se ha mostrado más sensible y util para este tipo de inyectables.

4. Análisis en conejos

a. Inyectables no contaminados

Los tres lotes cumplieron las especificaciones de ausencia de pirógenos de USP XXI (1985).

b. Inyectables contaminados

Las muestras de agua para inyección con 10, 100 y 1.000 gérmenes/mL no produjeron respuesta pirogénica en conejos, resultados que concuerdan con los de Marcus (1964) y Greppin (1973) (tabla 28); con 10.000 gérmenes/mL (tabla 29) el

ensayo fué positivo. Todas las muestras contaminadas, de cloruro sódico 0.9% y bicarbonato sódico 8.4%, dieron respuestas pirogénicas en conejos (tablas 30, 31 y 32).

En el caso del cloruro sódico 0.9% estos resultados son concordantes con los elevados recuentos anteriores a la esterilización y con las altas concentraciones de endotoxina por el método LAL "Coatest endotoxin". Sin embargo, en el caso del bicarbonato sódico 8.4% los recuentos microbianos eran bajos y el método LAL no definitivo por los problemas de inhibición. Se sugiere que el pH elevado de la solución y la temperatura de esterilización han podido producir cambios en la estructura del LPS de E. coli que lo hacen más pirogénico en conejos (ver Rietschel et al, 1985). El agua para inyección contaminada, con recuentos microbianos similares al bicarbonato sódico 8.4%, no produjo respuestas pirogénicas en conejos en las tres concentraciones de gérmenes más bajas. Esta observación puede indicar que el inyectable de bicarbonato sódico 8.4% posee alguna característica que lo hace más pirogénico después de la esterilización.

c. Inyección de endotoxina.

Los 8 conejos inyectados con 10 ng/kg de endotoxina E. coli

055:B5 experimentaron respuestas de temperatura mayores pirogénicas segun USP. Bleeker et al (1985) indicaban que el límite paso-fallo en conejos se había establecido en dosis de endotoxina de 2 a 20 ng/kg según el tipo de endotoxina inyectada.

5. Efecto de la endotoxina sobre la agregación plaquetaria

Como se observa en las gráficas, en sangre total se produce una agregación con concentraciones de endotoxina de 12.5 y 25 µg mientras que sobre PRP en lumiagregómetro no se detecta efecto agregante con esas dosis de endotoxina. Estos datos sugieren que la agregación en sangre total se produce por un material tromboplastínico liberado de los leucocitos que da lugar a la producción de trombina como indicaba Muller-Berghaus (1978).

El método de agregación en sangre total es válido solamente con dosis muy elevadas de endotoxina, pero no con concentraciones menores que producen fiebre (que excedan 50 pg/mL de endotoxina E. coli 055:B5 para dosis de 10 mL/kg).

V. CONCLUSIONES

1. Los análisis de pirógenos de los tres lotes de inyectables no contaminados han resultado negativos por el método en conejos, bajos recuentos microbianos anteriores a la esterilización y concentraciones de endotoxina menores de 40 pg/mL por el método LAL.

2. Los inyectables de agua para inyección contaminados con E. coli en concentraciones teóricas de 10, 100 y 1.000 gérmenes/mL y recuentos de gérmenes viables de 0 a 8 gérmenes/mL, resultaron no pirogénicos en conejos; por LAL se obtuvieron concentraciones de endotoxina menores de 40 pg/mL. La dilución de 10.000 gérmenes/mL dió resultados positivos en conejos y una

concentración media de endotoxina de 26.2 pg/mL.

3. En el inyectable contaminado de cloruro sódico 0.9% se obtuvieron recuentos de 4 a 5187 gérmenes/mL y concentraciones de endotoxina de 25 a 45000 pg/mL, estimadas por extrapolación. Los resultados en conejos fueron positivos para todas las diluciones de E. coli.

4. En el inyectable contaminado de bicarbonato sódico 8.4% se obtuvieron recuentos de 0 a 6 gérmenes/mL. La respuesta pirogénica en conejos no concordaba con las bajas concentraciones de endotoxina detectadas con LAL, lo que se sugiere puede ser debido a inhibición de la reacción LAL por el bicarbonato sódico, incluso en concentración de 0.84%.

5. El análisis microbiológico anterior a la esterilización puede ser un método de interés para control en proceso y para prever la calidad pirogénica de los inyectables terminados. Presenta como desventajas la rapidez con la que debe realizarse el análisis, inmediatamente después del llenado de los envases, y el tiempo de espera, durante la incubación de las muestras e identificación de los gérmenes.

6. El método LAL de detección de endotoxina de gérmenes Gram negativos se ha mostrado rápido y eficaz en agua para

inyección, control de material y en proceso.

7. En cloruro sódico 0.9%, con LAL "Coatest endotoxin" se han obtenido resultados concordantes en los recuentos microbianos y en conejos; con LAL "Pyrogent" se ha observado inhibición de la reacción de gelificación. Es preciso seleccionar el método LAL más adecuado para cada medicamento.

8. El bicarbonato sódico 8.4%, inhibió la reacción LAL, con una concentración de endotoxina estandar presente de 100 pg/mL. Detectó concentraciones de 10 pg/mL de endotoxina estandar, diluyendolo 1/10. Se sugiere que el posible mecanismo de la inhibición puede ser debido a la separación del ión calcio del reactivo, necesario para la reacción de gelificación del LAL.

9. El método de agregación plaquetaria ha permitido confirmar que para producirla con endotoxina, es preciso un mediador endógeno que está presente en sangre total pero no en el plasma rico en plaquetas. Sin embargo este método no resultó adecuado como ensayo de pirógenos, ya que las dosis de endotoxina necesarias para producir agregación plaquetaria son más elevadas que las dosis pirogénicas.

10. Se sugiere que en farmacia de hospital el análisis LAL puede ser útil por su sensibilidad y sencillez, si no se presentan

interferencias. En los inyectables de administración intratecal se hace imprescindible por su mayor sensibilidad que el ensayo en conejos. Junto con el recuento microbiano anterior a la esterilización pueden ser una alternativa al análisis en conejos. Este último, por su mayor dificultad de realización en una farmacia de hospital, puede quedar reducido a aquellos inyectables que presentan interferencias con el análisis LAL.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. **ALEXANDER P., EVANS R. (1971)** Endotoxin and double stranded RNA render macrophages cytotoxic Nature New Biol. 232, 76-78.

2. **ALSBERG C.L., CLARK E.D. (1908)** The blood clot of Limulus polyphemus. J. Biol. Chem., 5, 523.

3. **ANDERSON J.O., SJOBERG O., MOLLER G. (1972)** Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides. Eur. J. Immun. 2, 349-353.

4. **ARISTEGUI F.J. (1978).** Contribucion al conocimiento de los nuevos metodos de diagnostico de las meningitis purulentas con especial referencia a las tecnicas de contrainmunoelectroforesis y el test Limulus. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad del Pais Vasco.

5. **ARZNEIBUCH DER DEUTSCHEN DEMOCRATISCHEN REPUBLIK (1975)** 2. Ausgabe (2.AB-DDR). Akademie-Verlag. Berlin.

6. **ATKINS E., WOOD W.B. (1955a)** Studies on the pathogenesis of fever. I. The presence of transferable pyrogen in the blood stream following the injection of typhoid vaccine. J. Exp. Med. 101, 519-528.

7. **ATKINS E., WOOD W.B. (1955b)** Studies on the pathogenesis of fever. II. Identification of an endogenous pyrogen in the blood stream following the injection of typhoid vaccine. J. Exp. Med. 102, 499-516.

8. **ATKINS E., FREEDMAN L.R. (1963).** Studies in staphylococcal fever. I. Responses to bacterial cells. Yale J. Biol. Med. 35, 451-471.

9. **ATKINS E., HEIJN C. (1965)** Studies on tuberculin fever. III. Mechanism involved in the release of endogenous pyrogen in vitro. J. Exp. Med. 122, 207-235.

10. **ATKINS E., MORSE S.I. (1967)** Studies in staphylococcal fever. VI Responses induced by cell walls and various fractions of staphylococci and their

products. Yale J. Biol. Med. 39, 297-311.

11. **ATKINS E., FRANCIS L. (1973)** Role of lymphocytes in the pyrogenic response: comparison of endotoxin with specific and nonspecific mitogen, concanavalin A. En Kass E.H., Wolff S.M. (eds), "Bacterial lipolysaccharides" Univ. Chic. Press, Chicago; London. pp. 264-275.

12. **ATKINS E., BODEL P. (1974)** Fever. En Zweibach B. W., Grant L., Mc Clusky R.T. (eds). "The inflammatory process". Acad. Press, New York. pp. 467-514.

13. **ATKINS E., FRANCIS L., BERHEIM H.A. (1978)** Pathogenesis of fever in delayed hypersensitivity: role of monocytes. Infect. Immun. 21, 813-820.

14. **ATKINS E., BODEL P. (1979).** Clinical fever: its history, manifestations and pathogenesis. Fed. Proc. 38, 57-63.

15. **AVIS K.E. (1980)** Pyrogens in parenteral preparations. En " Remington's Pharmaceuticals Sciences" 16 Ed. Mack Publishing Co. p. 1485.

16. **BANES D. (1978).** Sterility tests and sterilization chapters in USP XX. J. Parent. Drug Ass. 4, 199-202.

17. **BANG F.B. (1956).** A bacterial disease of Limulus polyphemus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 98, 325-351.

18. **BANGHAM D. R. (1979)** Relevance and standardization in pyrogen tests. J. Pharm. Belg. 34, 134-136.

19. **BARACOS V., RODEMAN H.P., DINARELLO C.A., GOLDSBERG A.L. (1983).** Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E2 release by leukocytic pyrogen (interleukin-1). N. Engl. J. Med. 308, 553-558.

20. **BARONI C. D., RUCO L., DE FRANCESCHI S., UCINI S., ADORIN L., CHEN D. (1976)** Biological effects of Escherichia coli lipopolysacharide (LPS) in vivo. I. Selection in the mouse of thymus of killer and helper cells. Immunology 31, 217-224.

21. **BEISEL W.R. (1983).** Mediators of fever and mus-

cle proteolysis. N. Engl. J. Med. 308, 586-587.

22. **BERHEIM H.A., BLOCK L.H., ATKINS E. (1979).** Fever: Pathogenesis, pathophysyiology and purpose. Ann. Int. Med. 91, 261-270.

23. **BERRY L.J. (1975)** Metabolic effects of endotoxin. En D. Schlessinger (ed) "Microbiology" Amer. Soc. Microbiol., Washington D.C. pp. 315-319.

24. **BLEEKER W.K., KANNEGIETER E.M., BAKKER J.C., LOOS J.A. (1985)** Endotoxin in blood products: Correlation between the Limulus assay and the rabbit pyrogen test. En ten Cate J.W., Buller H., R., Sturk A., Levin J. (eds) "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance, and detection with the Limulus amebocyte lysate test" Alan R. Liss New York. pp. 293-302.

25. **BODEL P., ATKINS E. (1965)** Studies in staphylococcal fever. V. Staphylococcal filtrate pyrogen. Yale J. Biol. Med. 38, 282-298.

26. **BODEL P., DILLARD M. (1968)** Studies on steroid fever. I Production of leukocyte pyrogen in vitro

by etiocholanolone. J. Clin. Invest. 48, 107-117.

27. **BODEL P. (1970)** Studies on the mechanism of endogenous pyrogen production. I Investigation of new protein synthesis by stimulated human blood leukocytes. Yale J. Biol. Med. 43, 145-163.

28. **BODEL P. (1976)** Colchicine stimulation of pyrogen production by human blood monocytes. J. Exp. Med. 143, 1015-1056.

29. **BODEL P., MILLER H. (1976)** Pyrogen from mouse macrophages causes fever in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151, 93-96.

30. **BOOBIS S., HARTLEY R.E. (1981).** Measurement of hypozincaemia in mice: a sensitive test for detection of pyrogens. Clin. Sc. 61, 445-449.

31. **BORN G.V.R., CROSS M.J. (1963).** The aggregation of blood platelets. J. Physiol. 168, 178-195.

32. **BRAUDE A.I., CAREY F.J., SALESKY M. (1955)** Studies with radioactive endotoxin. J. Clin. Invest. 43, 858-865.

33. **BRAUDE A.I., Mc CONNELL J., DOUGLAS H. (1960)** Fever form pathogenic fungi. J. Clin. Invest. 39, 1266-1276.

34. **BRENTON D.D., BROWN R.E., WHARTON B.A. (1967)** Hypothermia in kwashiorkor. Lancet 1, 410-413.

35. **BRITISH PHARMACOPOEIA (1980)** vol II A154 Appendix XIV L. Her Mayestys Stationery Office. London.

36. **BRUNSON K.W., WATSON D.W. (1976)** Limulus amoebocyte lysate reaction with streptococcal pyrogenic exotoxin. Infect. Inmunol. 14, 1256-1258.

37. **BUSKIRK E.R., THOMPSON R.H., RUBENSTEIN M., WOLFF S.M. (1965)** Heat exchange in men and women following intravenous injection of endotoxin. J. Appl. Physiol. 19, 907-913.

38. **BUYNAK E.B., WEIBEL R.E., WHITMAN J.E., STOKES J. HILLEMAN M.R. (1969).** Combined live measles, mumps and rubella virus vaccines JAMA 207, 2259-2262.

39. **CARDINAL D.C., FLOWER R.J. (1980).** The electronic aggregometer: A. Nobel device for assessing platelet behaviour in blood. J. Pharmac. Method. 3, 135-158.

40. **CASTOR G.B., KANTOR N., KNOLL E., BLAKELY J., NIELSEN J.K., RANDOLPH J.O., KIRSBAUM A. (1971)** Characteristics of a highly purified pyrogenic lipopolisaccharide. J. Pharm. Sci. 60, 1578-1580.

41. **CHILLER J.M., SKIDMORE B.J., MORRISON D.C., WEIGLE W.O. (1973)** Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharides to its function in mitogenesis and adjuvanticity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2129-2133.

42. **CHUSID M.J., ATKINS E. (1972)** Studies in the mechanism of penicillin-induced fever. J. Exp. Med 136, 227-240.

43. **CISTERNA CANCER R. (1982)** Comunicación personal.

44. **CLINE M.J., MELMON K.L., DAVIS W.C., WILLIAMS H. E. (1968)** Mechanism of endotoxin interaction

with human leukocytes. Br. J. Haematol. 15, 539-547.

45. **CLOWES G.H.A., (Jr), GEORGE B.C., VILLEE C.A., (Jr), SARAVIS C.A. (1983).** Muscle proteolysis induced by a circulating peptide in patients with sepsis or trauma. N. Engl. J. Med. 308, 545-552.

46. **CO TUI F.W., SCHRIFT M.H. (1942).** Production of pyrogen by some bacteria. J. Lab. Clin. Med. 27, 569-575.

47. **COHEN P., GARDNER R.A. (1966)** Thrombocytopenia as a laboratory sign and complication of Gram-negative bactermic infection. Archs. Intern. Med. 117, 113-124.

48. **COLUCCI M., PARAMO J.A., COLLEN D. (1985)** Generation in plasma of a fast-acting inhibitor of plasminogen activator in response to endotoxin stimulation. J. Clin. Invest. 75, 818-824.

49. **COOPER J.F., LEVIN J., WAGNER H.N. (1971)** Quantitative comparison of in vitro and in vivo methods for the detection of endotoxin. J. Lab.

Clin. Med. 78, 138-148.

50. **COOPER J.F., HARBERT J.C. (1975).** Endotoxin as a cause of aseptic meningitis after radionuclide cisternography. J. Nuclear Med. 16, 809-813.

51. **COOPER, J.F. (1977).** Developing role of the Limulus test in pyrogen testing. Bull. Parent. Drug Ass. 31, 114-115.

52. **COOPER J.F., PEARSON S.M. (1977)** Detection of endotoxin in biological products by the Limulus test. Dev. Biol. Stand. 34, 7-13.

53. **COOPER J.F. (1979)** Acceptance of the Limulus test as an alternative pyrogen test for radiopharmaceutical and intrathecal drugs. Prog. Clin. Biol. Res. 29, 345-352.

54. **COOPER J.F. (1985)** Ideal properties of a LAL reagent for pharmaceutical testing. En ten Cate J.W., Buller H.R., Sturk A., Levin J. (eds) "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical

significance, and detection with the Limulus amebocyte lysate test" Alan R. Liss Inc. New York pp. 241-249.

55. **COOPER N.R., MORRISON D.C. (1978)** Binding and activation of the first component of human complement by the lipid A region of lipopolysaccharides. J. Immunol. 120, 1862-1868.

56. **CRITZ W.J. (1981).** Intracerebroventricular injection of rats: A sensitive assay method for endogenous pyrogen circulating in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 166, 6-11.

57. **DAOUST D.R., ORLOWSKI S.J., Mc MOHAN G., WEBER C.K., SHAW W.C., FISCHER T.C., BENNET C.R., GRAY A. (1976).** Limulus amoebocyte lysate test as a method for detection of endotoxins and endotoxin-like materials. Bull. Parent. Drug Ass. 30, 13-20.

58. **DARE J.G. (1953)** Some quantitative studies on a bacterial pyrogen. J. Pharm. Pharmacol. 5, 528-546.

59. **DAVIES D.A.L., MORGAN W.T.J., MOISSMAN W. (1954)** Studies in immunochemistry. 13. Preparation and properties of the "O" antigen of Shigella dysenteriae (SHIGA). Biochem. J. 56, 572-587.

60. **DE GAETANO G. (1982)** Piastrine, trombosi e aterosclerosi. Masson Italia Editori. Milano. pp. 53 y 93.

61. **DEL POZO A. (1978)** Farmacia Galénica Especial. Romargraf S.A., Barcelona.

62. **DEUTCHES ARZNEIBUCH (1978)** 8. Ausgabe. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart; Govi-Verlag GMBH., Frankfurt.

63. **DEUT. APOTH.-ZTG. (1985)** Limulus Test Angenommen 63 Sesion de la Comision de la Farmacopea Europea. 125, 2603-2604.

64. **DEUT.APOTH.- ZTG. (1986)** Demnachst Limulus-Amobozyten Lysat-Test auf Endotoxine. 126, 644-646.

65. **DEY D.K., FELDBERG W., WENDLANDT S. (1974)** Lipid

A and prostaglandin fever. J. Physiol. 239, 102.

66. **DIDING N.** (1979) The Limulus test and pyrogen testing. J. Pharm. Belg. 34, 159-160.

67. **DINARELLO C.A., BODEL P. T., ATKINS E.** (1968) the role of the liver in the production of fever and in pyrogenic tolerance. Trans. Assoc. Am. Phys.81, 334-344.

68. **DINARELLO C. A., RENFER L., WOLFF S.M.** (1977) The production of antibody against human leukocytic pyrogen. J. Clin. Invest. 60, 465-472.

69. **DINARELLO C.A., ELIN R.J., CHEDID L., WOLFF S.M.** (1978) The pyrogenicity of synthetic adjuvants. J. Infect. Dis. 138, 760-767.

70. **DINARELLO C.A., WOLFF S.M.,** (1978) Pathogenesis of fever in man. N. Engl. J. Med. 298, 607-612.

71. **DINARELLO C.A.** (1980) Endogenous pyrogens in fever. En Lipton J.M. (ed) Raven Press, New York.

72. **DINARELLO C.A., BERHEIM H.A.** (1981). Abili- of human leukocytic pyrogen to stimulate brain

prostaglandin synthesis "in vitro". J. Neurochem., 37, 702-708.

73. **DINARELLO C.A., WOLFF S.M. (1982)** Exogenous pyrogens. En "Pyretics and antipyretics". Handb. Exp. Pharm. 60, 73-112.

74. **DONY J. (1979)** Les endotoxins et leurs effects biologics. J. Pharm. Belg. 34, 127-133.

75. **DRESSEL H. (1976).** Remarks on the investigation of sodium nucleinate by means of the Limulus amebocyte lysate test. Acta Biol. Med. Germ. 35, 1027-1029.

76. **EIBERT J. (1972)** Pyrogen testing: Horseshoe crabs vs. Rabbits. Bull. Parenter. Drug Assoc. 26, 253-260.

77. **ELIN R.J., WOLFF S.M. (1973a)** Nonspecificity of the Limulus amoebocyte lysate test: positive reactions with polynucleotides and proteins. J. Infect. Dis. 128, 349-352.

78. **ELIN R.J., WOLFF S.M. (1973b)** Bacterial endoto-

xins. En Laskin A.I., Lechevalier H.A. (eds) "Handbook on microbiology". CRC Press Cleveland. pp. 215-239.

79. **ELIN R.J., SANDBERG A.L., ROSENSTREICH D.L. (1976)** Comparison of the pyrogenicity, Limulus activity, mitogenicity and complement reactivity of several bacterial endotoxins and related compounds. J. Inmunol. 117, 1238-1242.

80. **FARMACOPEA INTERNACIONAL (1980)** 3a ed. Métodos generales de análisis. Vol 1 Publicaciones OMS. Ginebra.

81. **FARR R. S. (1959)** Fever as a manifestation of an experimental allergy. J. Allergy 30, 268-269.

82. **FAULI C., MARGALET A., JANE J. (1985)** Validación del ensayo LAL para control de pirógenos en soluciones parenterales. Comunicación presentada en el XXX Congreso Nacional de Farmacéuticos de Hospital. Las Palmas de Gran Canaria.

83. **FEDERAL REGISTER (1983)** Human, Biological and Animal Drugs and Medical Devices; Availability of

Draft Guideline for Use of the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test 48, 13096-13908.

84. **FINE D.H., KESSLER R.E., TABAK L.A., SCHOCKMAN G.D. (1977).** Limulus lysate activity of lipoteichoic acids. J. Dent. Res. 56, 1500-1501.

85. **FLYN A., FINKE J.H., HILFIKER M.L. (1982).** Placental mononuclear phagocytes as a source of interleukin-1. Science 218, 475-477.

86. **FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (1983)** Draft guideline for validation of the Limulus amebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products and medical devices. National Center for Drugs and Biologics Office of Drugs. 14-27.

87. **FRIBERGER P., KNOS M., MELLSTAM L. (1982).** A quantitative endotoxin assay utilizing LAL and a cromogenic substrate. En Watson S.W., Levin J., Novitsky T.J. (eds) "Endotoxins and their detection with the Limulus amebocyte lysate test" Alan R. Liss New York. pp. 195-206.

88. **FUMAROLA D., PASQUETTO N., BRANDONISIO O., MARCUCCIO L., PANARO A., MONNO R.** (1975) Limulus test e preparazioni iniettabili apirogene. Studio piloto. Quad. Sclavo Diagn., 11, 735-746.

89. **FUSSELLIER M., LAGODSKY H., BENARD M., BRIN M.A., DESCHAMPS F., MAIGNAN M., MERLIN L., PERRAULT G., RINJARD P., STORCK J., WACHTER A.** (1977). Le test Limulus. R. Sci. Tech. Pharm. 6, 293-305.

90. **FUSSELLIER M.** (1979) Applications pratiques du LAL dans l'industrie pharmaceutique. J. Pharm. Belg. 34, 3, 137-141.

91. **FUSSELLIER M., LAGODSKY H., STORCK J., BENARD M., BRIN A., DESCHAMPS F., MAIGNAN N., MERLIN L., PERRAULT G., RINJARD P., WACHTER A.** (1983) Le test Limulus. Sci. Techn. Pharm. 12, 433-434.

92. **GALANOS C., LUDERITZ O., WESTPHAL O.** (1971) Preparation and properties of antisera against lipid A component of bacterial lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem. 24, 116-122.

93. **GALANOS C., RIETSCHEL E.T., LUDERITZ O., WESTPHAL O. (1972)** Biological activities of lipid A complexed with bovine serum albumin. Eur. J. Biochem. 31, 230-233.

94. **GALANOS C. (1975)** Physical state and biological activity of lipopolysaccharides. Toxicity and immunogenicity of the lipid A component. J. Immunol. 149, 214-229.

95. **GALANOS C., LUDERITZ O. (1976)** The role of the phisical state of lipopolysaccharides in the interaction with complement. J. Biochem. 65, 403-408.

96. **GALANOS C., LUDERITZ O., RIETSCHEL E.T., WESTPHAL O. (1977).** Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides with special reference to their lipid A component. Int. Rev. Biochem. 14, 239-335.

97. **GALANOS C., ROPPEL J., WECKESSER J., RIETSCHEL E.T., MAYER E. H. (1977)** Biological activities of lipopolysaccharides and lipid A from Rhodos-

pirillaceae. Infect. Immun. 16, 407-412.

98. **GALANOS C., LUDERITZ O., WESTPHAL O. (1979)** Preparation and properties of a standardized lipopolysaccharide from Salmonella abortus equi (rous-pyrexal). Zbl. Bakt. Hyg. 243, 226-244.

99. **GANDER G.W. (1982)** Endogenous pyrogens in "Pyretics and antipyretics". Handb. Exp. Pharm. 60, 113-123.

100. **GERY I., GERSHON R.K., WAKSMAN B.H. (1972)** Potentiation of T lymphocytes response to mitogens. II. The responding cell J. Exp. Med. 136, 128-142.

101. **GLAUERT A.M., THORNLEY M.J. (1969)** The topography of the bacterial cell wall. Microbiol. 23, 159-19198 159-198.

102. **GOLDMAN R.C., LEIVE L. (1980)** Heterogeneity of antigenic-side-chain length in lipopolysaccharide from Escherichia coli 0111 and Salmonella typhimurium LT2. Eur. J. Biochem. 107, 145-153.

103. **GOOD C.M., LANE H.E. Jr (1977)** The biochemistry of pyrogens. Bull. Parenteral Drug Ass. 31,

116-120.

104. **GOTZE O., MULLER-EBERHARD H.J. (1971).** The C3-activator system: an alternate pathway of complement activation. J. Exp. Med. 134, 90s-108s.

105. **GRAHAM, D.T. (1978).** The Limulus Amoebocyte lysate pyrogen test. Aust. J. Hosp. Pharm., 8, 96-102.

106. **GRANT R. (1950)** Emotional hypothermia in rabbits. Amer. J. Physiol. 160, 285-305.

107. **GREISMAN S.E., HORNICK R.B. (1969)** Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 1154-1158.

108. **GREISMAN S.E., HORNICK R.B. (1976)** Endotoxin tolerance. En Beers R.F., Basset J., Basset E.G. (eds). "The role of immnunological factors in infectious, allergic and autoimmune disease" Raven Press, New York. pp. 43-50.

109. **GREPPIN R., NGUYEN B.T. (1973)** Quelques problèmes de preparation et de controle des injectables dans une pharmacie d'hopital. Rev. Port.Farm. 23, 255-264.

110. **GUILFOYLE D.E., MUNSON T.E. (1982)** Procedures for improving detection of endotoxin in products found incompatible for direct analysis with Limulus amebocyte lysate. En Watson S.W., Levin J., Novitsky T.J. (eds) "Endotoxins and their detection with the Limulus amebocyte lysate test" Alan R. Liss. New York. Inc. pp. 79-90.

111. **HAHN H.H., CHAR D.C., POSTEL W.B., WOOD W.B, (Jr) (1967) Studies on the pathogenesis of fever. XV. The production of endogenous pyrogen by peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 126, 385-394.**

112. **HALEY L.D., MEYER R., ATKINS E. (1966)** Studies in crytococcal fever. II Response of sensitized and unsensitized rabbits to various substances derived from cryptococcal cells. Yale J. Biol. Med. 39, 165-185.

113. **HALL C.H., (Jr), ATKINS E. (1959)** Studies on tuberculin fever. I The mechanism of fever in tuberculin hypersensitivity. J. Exp. Med 109, 339-359.

114. **HALL W.J., FRANCIS L., ATKINS E. (1970)** Studies on tuberculin fever. IV. The passive transfer of reactivity with various tissues of sensitized donor rabbits. J.Exp. Med. 131, 483-498.

115. **HARRISON S.J., TSUJI K., ENZINGER R.M. (1979)** Application of LAL for detection of endotoxin in antibiotic preparations. En Cohen E., Bang F., Levin L., Marchalonis J.J., Pistole T.G., Prenderpast R.A., Schuster C., (Jr), Watson S.W. (eds) "Biomedical Applications of the horseshoe crab (Limulidae)". Alan R. Liss Inc. New York. pp. 353-365.

116. **HOCHSTEIN H.D., ELIN R.J., COOPER J.F., SELIGMANN E.B., (Jr), WOLFF S. (1973).** Further developments of Limulus amoebocyte lysate test. Bull. Parent. Drug. Ass. 27, 139-148.

117. **HOCHSTEIN H.D. (1985)** Quality control for LAL and endotoxin. En ten Cate J.W., Buller H.R., Sturk A., Levin J. (eds) "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance, and detection with the Limulus amebocyte lysate test" Alan R. Liss, Inc., New York. pp. 221-239.

118. **HOFFMAN-GOETZ L., Mc FARLANE D., BISTRIAN B.R., BLACKBURN G.L. (1981)** Febrile and plasma iron responses of rabbits injected with endogenous pyrogen from malnourished patients. Am. J. Clin. Nutrit. 34, 1109-1116.

119. **HOLLAND W.W., WHITEHEAD T.P. (1974).** Value of new laboratory tests in diagnosis and treatment. Lancet 2, 391-394.

120. **HORT E.C., PENFOLD W.J. (1912).** Relation of salvarsan fever to other forms of injection fever. Proc. Roy. Soc. Med. 5, 131-139.

121. **HUNGARIAN PHARMACOPOEIA VI Ed. (1970)** vol 1.

122. **INGERMAN-WOJENSKI C., SMITH J.B., SILVER M.J. (1983)** Evaluation of electrical aggregometry:

comparison with optical aggregometry, secretion aggregometry, secretion of ATP, and accumulation of radiolabeled platelets. J. Lab. Clin. Med. 101, 44-52.

123. **INOUYE M.** (1979) Bacterial outer membranes. Biogenesis and functions. Wiley-Intersciences, New York.

124. **INGRAHAM J.L., MAALOE O., FREDERICK C.** (1983) "Growth of the bacterial cell". Neidhart, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachussets.

125. **JANE J., MARGALET, A., POU A.** (1983) Detección comparativa de endotoxinas (pirogenos) mediante el ensayo del LAL (Limulus amebocyte lysate) y el método oficial de la Farmacopea Europea (conejos) en soluciones parenterales. Comunicación presentada en el IX Congreso Nacional de Microbiología. Valladolid.

126. **JOHNS M. A., BRUINS S.C., McCABE W.R.** (1977) Immunization with R mutants of Salmonella minnesota. II. Serological response to lipid A and

the lipolysaccharide of the mutants. Inf. Immun. 17, 9-15.

127. **JORGENSEN J.H., SMITH R.F. (1973).** Preparation, sensitivity, and specificity of Limulus lysate for endotoxin assay. Appl. Microbiol. 26, 43-48.

128. **JORGENSEN J.H., SMITH R. (1974)** Measurement of bound and free endotoxin by the Limulus assay. Proc. Soc. Exp. Biol. 146, 1024-1031.

129. **KABIR S., ROSENSTREICH D.L., MERGENHAGEN S.L. (1978)** Bacterial endotoxins and cell membranes. En Jeljaszewicz J., Wadstrom T. (eds) "Bacterial toxins and cell membranes". Academic Press New York. pp. 59-87.

130. **KAMPSCHMIDT R.F., UPCHURCH H.F. (1962)** Effects of bacterial endotoxin on plasma iron. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 110, 191-193.

131. **KAMPSCHMIDT R.F., LONG R.D., UPCHURCH H.F. (1972)** Neutrophil releasing activity in rats injected with endogenous pyrogen. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 139, 1224-1226.

132. **KANOH S., KAWASAKI H. (1966)** Studies on myxovirus pyrogen. I Interaction of myxovirus and rabbit polymorphonuclear leukocytes. Biken J. 9, 177-184.

133. **KANOH S., NISHIO A., KAWASAKI H. (1977).** Studies on pyrogenic tolerance to bacterial lipopolysaccharide in rabbits. Biken J. 20, 69-75.

134. **KARANICOLAS S., OTEOPULOS D.G., SHAIZAT R.N., SEPP H., DARBY T. (1977)** Epidemic of aseptic peritonitis caused by endotoxin during chronic peritoneal dialysis. N. Engl. J. Med. 296, 1336-1337.

135. **KASAI N. (1966)** Chemical studies on the lipid component of endotoxin, with special emphasis on its relation to biological activities. Ann. New York Acad. Sci. 133, 486-507.

136. **KASS E. H., PORTER P.J., Mc GILL M.W., VIVALDI E. (1973)** Clinical and experimental observations of endotoxemia. En Kass E. H. (ed) "Bacterial lipopolysaccharides" Univ. Chic. Press Chicago; London. pp. 291-294.

137. **KESSEL R.W.I., BRAUN W. (1965)** Cytotoxicity of endotoxin in vitro. Effects on macrophages from normal guinea pigs. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 43, 511-522.

138. **KIMURA H. (1976)** Measurement of endotoxin. Comparison of reactivities measured by radioinmunoassay and with the Limulus test. Acad. Med. Okayama 30, 257-270.

139. **KLEIN K.B., SUSKIN D.R., MERTZ G., KULAPONGS P., OLSON R.E. (1974)** Detection of endotoxin. Lancet 2, 50.

140. **KOBAYASHI M., MORIMOTO T., YAMAMOTO M. (1975)** Studies of the gelation reaction of Limulus lysate (pre gel). III. Influences of various substances on the gelation reaction of Limulus lysate. Yakugaku Zasshi 95, 720-727.

141. **KOLB C., PAULI R.D., WEILER E. (1974)** Induction of IgG by lipid A in the newborn mouse. Med. 139, 467-471.

142. **KOTANI S., WATANBE Y., KINOSHITA F. et al (1977)** Gelation of the amoebocyte of Tachypleus tridentatus by cell wall digest of several Gram-positive bacteria and synthetic peptidoglycan subunits of natural and unnatural configuration. Biken J. 20, 5-10.

143. **KRUGER D., ZIMMERMANN G., HEBOLD G. (1976)** In vitro-Pyrogenprufung mittels des Limulus Tests. 2. Mitteilung der Ergebnisse. Arzneim.-Forsch. 26, 21-22.

144. **KURE R., GRENDAHL H., PAUSEN J. (1982)** Pyrogens from surgeon's sterile latex gloves. Acta Path. Immunol. 90, 85-88.

145. **LAEMMLI U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

146. **LAFUENTE J., HERCULES J. (1986)** La esterilización por vapor aplicada a líquidos envasados. Symposium Internacional sobre Procesos de Esterilización. Centro Nacional de Farmacobiología. 29-31 enero. Majadahonda (Madrid).

147. **LAFUENTE J. (1986)** Comunicación personal.

148. **LAGODSKY, H. (1979).** "Limulus test" Endotoxines et substances pyretogenes. J. Pharm. Belg., 34, 125-126.

149. **LEIVE L. (1965)** Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of E. coli. Bichem. Biophys. Res. Commun. 21, 290-296.

150. **LEONG D., DIAZ R., MILNER K., RUDBACH J., WILSON J.B. (1970)** Some structural and biological properties of Brucella endotoxin. Infect. Immun. 1, 174-182.

151. **LEVIN J., BANG F.B. (1968)** Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diathes. Haemorrh. 19, 186-197.

152. **LEVIN J., TOMASULO P.A., OSER R.S. (1970)** Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. J. Lab. Clin. Med. 75, 903-911.

153. **LEVIN J. (1985)** The history of the development of the Limulus amebocyte lysate test. En ten Cate J.W., Buller H.R., Sturk A., Levin J. (eds) "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance, and detection with the Limulus amebocyte lysate test" Alan R. Liss Inc. New York. pp. 3-28.

154. **LINNEMANN C.C., STEICHEN J., SHERMAN W.G., SCHIFF G.M. (1974)** Febrile illness in early infancy associated with ECHO virus infection. Pediatrics 84, 49-54.

155. **LIPTON J.M., KENNEDY J.I. (1979).** Central thermosensitivity during fever produced by intra-PO/AH and intravenous injections of pyrogen. gen. Brain Res. Bull. 4, 23-24.

156. **LIPTON J.M., TICKNOR C.B. (1979)** Influence of sex and age on febrile responses to peripheral and central administration of pyrogens in the rabbits. J. Physiol. 295, 263-272.

157. **LOEB L. (1902)** On the blood lymph cells and

inflamatory processes of Limulus. J. Med. Res. 7, 145.

158. **LUDERITZ O., GALANOS C., LEHMANN V., NURMINEN M., RIETSCHEL E. Th., ROSENFELDER G., SIMON M., WESTPHAL O. (1973)** Lipid A: chemical structure and biological activity. J. Infect. Dis. 128, (supp) 17-29

159. **LUDERITZ O., TANAMOTO K., GALANOS C. MCKENZIE G.R., BRADE H., ZAHRINGER U., RIETSCHEL E.Th., KUSUMOTO S., SHIBA T. (1984)** Lipopolysaccharides: Structural principles and biologic activities. Rev. Infect. Dis. 6, 428-431.

160. **LUGTENBERG B., VAN ALPHEN L. (1983)** Molecular architecture and functioning of the outer membrane of Escherischia coli and other Gram-negative bacteria. Biochim. Biophys. Acta 737, 51-115.

161. **MAIGNAN N. (1978)** Recherche de substances pyrogenes par LAL dans les produits de contraste. Deuxieme Technique d'ultrafiltration. Lab. Pharma.

26, 677-680.

162. **MANNEL D., MAYER H. (1978)** Isolation and chemical characterization of the enterobacterial common antigen. Eur. J. Biochem. 86, 361-370.

163. **MANNING J.K., REED N.D., JUTILA J.W. (1972)** Antibody response to Escherischia coli lipopolysaccharide and type III pneumococcal polysaccharide by congenitally thymusless nude mice. J. Immunol. 108, 1470-1472.

164. **MARCUS, S. (1964)** Determination of pyrogens using membrane filtration. Meeting of the Parenteral Drug Association. Philadelphia.

165. **MARCUS S., NELSON J.R. (1977).** Tests alternative to the rabbit bioassay for pyrogens. Develop. Biol. Standard. 34, 45-55.

166. **MARSHALL M.T. (1964)** Effects of endotoxin on appetite and alimentary function in mice. En Landy M., Braun W. (eds) "Bacterial endotoxins Inst. Microbiol. Rutgers, The State University, New Brunswick, N.J. pp. 198-204.

167. **MASCOLI C. (1979)** Limulus amebocyte lysate (L.A.L.) test for detecting pyrogens in parenteral injectables and medical devices. J. Pharm. Belg. 34, 145-155.

168. **MASCOLI C., WEARY M.E. (1979)** Applications and advantages of the Limulus amebocyte lysate (LAL) pyrogen test for parenteral injectable products. Prog. Clin. Biol. Res. 29, 387-402.

169. **MASEK K., KADLECOVA O., PETROVICKY P.** (1978) Pharmacological activity of bacterial peptidoglycan: the effect on temperature and sleep in the rat. Toxicon (Suppl.) 1, 991-1003.

170. **MAY C.N., WISEMAN R., (Jr) (1972)** Establishment and operation of a hospital pyrogen assay program. Am. J. Hosp. Pharm. 29, 684-686.

171. **MC AULEY R.J., ICE R.D., CURTIS E.G.** (1974) Establishment of the Limulus test for in vitro pyrogen detection. Am. J. Hosp. Pharm. 31, 688-691.

172. **MC CULLOUGH K.Z., SCOLNICK S.A. (1976)** Effect of semisynthetic penicillins on the Limulus lysate test. Microbiol. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 9, 856-858.

173. **Mc CULLOUGH K.Z. (1982)** The use of LAL as an alternative to the CFR rabbit pyrogen test for disodium ticarcillin. En Watson S.W., Levin J., Novitsky T.J. (eds) "Endotoxin and their detection with the Limulus amebocyte lysate test" Alan R. Liss. Inc. New York. pp. 91-100.

174. **MERLIN L. (1979)** Controle des preparations radiopharmaceutiques a l'aide du lysat d'amoebocytes de Limulus polyphemus. J. Pharm. Belg. 34, 164-165.

175. **MILNER K.C., FINCKELSTEIN R.A. (1966).** Bioassay of endotoxin: Correlation between pyrogenicity for rabbits and lethality for chick embryos. J. Infect. Dis. 116, 529-536.

176. **MORENO E. (1980)** Purification, chemical characterization and biological activity of Brucella

lipopolysaccharide. Doctoral Thesis. University of Wisconsin. Madison.

177. **MORENO J.L. (1982).** Comunicacion personal.

178. **MORITA T., NAKAMURA T., MIYATA T., SADAAKI I. (1985)** Biochemical characterization of Limulus clotting factors and inhibitors wich interact with bacterial endotoxins. En ten Cate W.J., Buller H.R., Sturk A., Levin J. (eds) "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance and detection with the Limulus amebocyte lysate test" Alan R. Liss Inc. New York. pp. 53-64.

179. **MORRISON D.C., KLINE L.F. (1977)** Activation of the clasical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). J. Immunol. 118, 362-369.

180. **MOTT P.D., WOLFF S.M. (1966)** The association of fever and antibody response in rabbits immunized with human serum albumin. J. Clin. Invest. 45, 372-379.

181. **MULLER-BERGHAUS G. (1978)** The role of platelets leukocytes and complement in the activation of intravascular coagulation by endotoxin. En de Gaetano G., Garattini S. (eds) "Platelets: A multidisciplinary approach". Raven Press New York. pp. 303-320.

182. **MULLER-CALGAN H. (1982)** Experiences with comparative examinations for pyrogens by rabbit pyrogen test versus the LAL test. En Watson S.W., Levin J., Novitsky J. (eds) "Endotoxins and their detection with the Limulus amebocyte lysate test" Alan R. Liss, Inc., New York. pp. 343-356.

183. **MULLICK P.K., MOZA B.K. (1977).** Pyrogen testing. Pharm. Tim. 9, 15-20.

184. **MUNSON T.E. (1985)** Guideline for validation of the LAL test as an end-product endotoxin test for human and biological drug products. En ten Cate J.W., Buller H.R., Sturk A., Levin J. (eds) "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance and detection with the Limulus amebocyte lysate test" Alan R. Liss Inc. New

York. pp. 211-220.

185. **MURATA H., KOBAYASHI M., LIO M., YAMADA H., CHIBA K., MATSUI K., KAWAGUCHI S. (1976)** Sensitivity of the Limulus test and inhibitory factors in the radiopharmaceuticals. J. Nucl. Med. 17, 1088.

186. **MURPHY P.A., CEBULA T.A., LEVIN J., WINDLE B.E. (1981a)** Rabbit macrophages secrete two biochemically and inmunologically distinct endogenous pyrogens Infect. Immun. 34, 177-183.

187. **MURPHY P.A., CEBULA T.A., WINDLE B.E. (1981b)** Heterogeneity of rabbit endogenous pyrogens is not attributable to glycosylated variants of a single polypeptide chain. Infect. Inmun. 34 (1) 184-191.

188. **NANDAN R., BROWN D.R. (1977).** An improved in vitro pyrogen test: To detect picograms of endotoxin contamination in intravenous fluids using Limulus amoebocyte lysate. J. Lab. Clin. Med. 89, 910-918.

189. **NEVILLE D.M. (1971)** Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinous buffer system. J. Biol. Chem. 246, 6328-6334.

190. **NEWSOME P.M. (1977)** Penicillins and the Limulus amoebocyte lysate test for endotoxin. J. Pharm. Pharmac. 29, 704-706.

191. **NIGAN V.N. (1975)** Effect of core lipopolysaccharide from Salmonella minnesota mutants on the survival times of mice bearing Ehrlich tumor. Canc. Res. 35, 628-633.

192. **NIKAIDO H. (1976)** Outer membrane of Salmonella typhimurium transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. Biochim. Biophys. Acta 433, 118-132.

193. **NIWA M., HIRAMATSU T., WAGURI O. (1974)** The gelation reaction between horseshoe crab amoebocytes and endotoxins studied by the quantitative clot protein method. Jap. J. Med. Sci. Biol. 27, 108-111.

194. **NORDLUND J.J., WOLFF S.M., LEVY H.B. (1970)** Inhibition of biologic activity of poli I: poli C by human plasma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 439-444.

195. **NOWOTNY A., BOHLING V.H., CHANG L. (1975)** Relation of structure to function in bacterial endotoxins. VIII Biological activities in a polysaccharide rich fraction. J. Immunol. 115, 199-203.

196. **NYERGES G., JASZOVSZKY I. (1981)** Reliability of the rabbit pyrogen test and of the Limulus test in predicting the pirogenicity off vaccines in man. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 28, 235-243.

197. **OMS**, Series de Informes tecnicos: 56, (1952); 638, (1979); 658, (1981); 687, (1983).

198. **OMS**, Sustancias Biologicas, Patrones de Referencia y Reactivos de Referencia Internacionales. Pirogenos. 64, (1982); 66, (1984).

199. **OROSZLAN S., McFARLAND V.M., MORA P.T., SHEAR M.J. (1966)** Reversible inactivation of an endo-

toxin by plasma proteins. Ann. New York Acad. Sci. 133, 622-628.

200. **OSBORN M.J., GANDER J.E., PARISI E., CARSON J. (1972)** Mechanism of assembly of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. 247, 3962-3972.

201. **PATTERSON M.R., McQUILLAN T.A. (1979).** Experience with Limulus amoebocyte lysate testing of parenteral solutions. J. Pharm. Belg. 34, 172-173.

202. **PEARSON A.D., CALDER M. W., MEERS P.D. (1973)** Assay of endotoxin. Lancet 1, 1194-1195.

203. **PEARSON F.C., WEARY M. (1980).** The significance of the Limulus amebocyte lysate test specificity on the pyrogen evaluation of parenteral drugs. J. Parent. Drug Ass. 34, 103-108.

204. **PEARSON F.C., WEARY M.E., BOHON J., DABBAH R., (1982).** Relative potency of "environmental" endotoxin as measured by the Limulus amebocyte ly-

sate test and the USP rabbit pyrogen test. En Watson, S.W., Levin J., Novitsky T.J. (eds) "Endotoxins and their detection with the Limulus amebocyte lysate test" Alan R. Liss Inc. New York. pp. 65-67.

205. **PEARSON F.C. (1985)** A comparison of the pyrogenicity of environmental endotoxins and lipopolysaccharides. En ten Cate J.W., Buller H.R., Sturk A., Levin J. (eds) "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance, and detection with the Limulus amebocyte lysate test". Alan R. Liss Inc. New York. pp. 251-263.

206. **PEAVY D.L., BAUGHN R.E., MUSHER D.M. (1979)** Effects of BCG infection on the susceptibility of mouse macrophages to endotoxin. Infect. Immun. 24, 59-64.

207. **PEKARECK R.S., BEISEL W.R. (1971)** Characterization of the endogenous mediator(s) of serum zinc and iron depression during infection and other stresses. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 728-731.

208. **PERICIN C. (1979).** In vitro determinations of pyrogenicity by means of the Limulus test. J. Pharm. Belg. 34, 166-167.

209. **PERSONEUS G.R. (1969)** Pyrogen testing of small volume parenterals. Bull. Parent. Drug Ass. 23, 201.

210. **PERSONEUS, G.R. (1973).** Pyrogen testing of parenteral pharmaceutical en Cooper M. (ed) "Quality control in the pharmaceutical industry" Academic Press, Inc. New York. pp. 239-268.

211. **PHARMACOPEIA EUROPEAN (1980)** 2a ed. V.2.1.4. Part I. Maisonneuve S.A. Paris.

212. **PHARMACOPEIA EUROPEAN COMMISSION (1983)** Group of Experts No. 1L. Limulus Amoebocyte Lysate Test (LAL) Council of Europe.

213. **PHARMACY INTERNATIONAL (1983)** Quality control of parenteral products. 4, 128.

214. **PHILIPPE J. (1967)** Les methodes statistiques en pharmacie et en chimie. Masson et Cie. Paris.

215. **POE W.J., MICHAEL J.G. (1976)** Separation of the mitogenic and antigenic responses to bacteria lipopolysaccharide. Immunol. 30, 241-247.

216. **POWANDA M.C., BEISEL W.R. (1982).** Hypothesis: Leukocyte endogenous mediator / endogenous pyrogen / lymphocyte-activating factor modulates the development of non specific and specific immunity and affects nutritional status. Am. J. Clin. Nutr. 35, 762-768.

217. **PROBEY T.F., PITTMAN M. (1945).** The pirogenicity of bacterial contaminants found in biologic products. J. Bacteriol. 50, 397.

218. **PUGSLEY A.P., SCHNAITMAN C.A. (1978)** Identification of three genes controlling production of new outer membrane pore proteins in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 135, 1118-1129.

219. **RADEMAKER L. (1930)** The cause and elimination of reaction after intravenous infusions. Ann. Surg. 92, 195-201.

220. **RASTOGI S.C., HOCHSTEIN H.D., SELIGMAN E.B. (1977)** II. Quality control procedures for testing Limulus amoebocyte lysate sensitivity using reference endotoxin Bull. Parent. Drug Ass. 31, 120-127.

221. **RIEDER R.F., THOMAS L. (1960)** Studies on the mechanism involved in the production of abortion by endotoxin. J. Immunol. 84, 189-193.

222. **RIETSCHEL E.T., WOLLENWEBER H.W., RUSSA R., BRADE H., ZAHRINGER U. (1984).** Concepts of the chemical structure of lipid A. Rev. Infect. Dis. 6, 432-438.

223. **RIETSCHEL E.Th., BRADE H., BRADE L., KACA W., KAWAHARA K., LINDNER B., LUDERITZ T., TOMITA T., SCHADE U., SEYDEL U., ZAHRINGER U. (1985)** Newer aspects of the chemical structure and biological activity of bacterial endotoxins. En ten Cate J. W., Buller H.R., Sturk A., Levin J. "Bacterial endotoxins: Structure, biomedical Significance, and detection with the Limulus amebocyte lysate test. Alan R. Liss Inc. New York. pp 31-50.

224. **RINJARD P. (1979)** Le test Limulus pour le contrôle d'eau et des substances utilisees dans les preparations injectables. Pharm. Belg. 34, 168-169.

225. **ROBINO A., ZACCARIA A. (1976).** Uso del Lisato di Amebociti di Limulus polyphemus per il controllo dei pirogeni in preparazioni iniettabili. Boll. S.I.F.O.,22,459-465.

226. **RODRIGUEZ-SASIAIN (1986)** Comunicacion personal.

227. **RONNEBERG H.J. (1977)** Comparison of the pyrogen tests in rabbits with Limulus lysate. Dev. Biol. Stand. 34, 27-32.

228. **ROTTA J. (1975)** Endotoxin-like properties of the peptidoglycan. Z. Immunitaetforsch. Immunbiol. 149, 230-244.

229. **ROWLEY D., HOWARD J.G., JENKINS C.R. (1956)** The fate of 32P-labeled bacterial lipopolysaccharide in laboratory animals. Lancet 270, 366-368.

230. **RUDDERS R.A. (1972)** Treatment of advanced malig-

nant lymphomas with bleomycin. J. Hematol. 40, 317-332.

231. **RUSSELL-SMITH N.C., FLOWER R.J., CARDINAL D.C. (1981).** Measuring platelets and leukocyte aggregation/adhesion responses in very small volumes of whole blood. J. Pharmac. Methods 6, 315-333.

232. **SALVIN S.B., PETERSON R.D.A., GOOD R. A. (1965)** The role of the thymus in resistance to infection and endotoxin toxicity. J. Lab. Clin. Med. 65, 1004-1022.

233. **SCRIMSHAW N.S., TAYLOR C.E., GORDON J.E. (1968)** Interactions of nutrition and infection. Monograph OMS.

234. **SEIBERT, F. B. (1923).** Fever-producing substance found in some distilled waters. Amer. J. Physiol. 67, 90-123.

235. **S EIBERT F.B. (1925).** The cause of many febrile reactions following intravenous injections. Amer. J. Physiol. 71, 621-651.

236. **SHANDS J.W. (1975)** Endotoxin as a pathogenic mediator of gram-negative infection. En Schlessinger D. (ed) "Microbiology" Amer. Soc. Microbiol. Washington. pp. 330-335.

237. **SKIDMORE B.J., CHILLER J.M., MORRISON D.C., WEIGLE W.O. (1975)** Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharides (LPS): correlation betwen the mitogenic adjuvant and immunogenic activities. J. Immunol. 114, 770-775.

238. **SOLUM N.O. (1973)** The coagulogen of Limulus polyphemus hemocytes. A comparison of the clotted forms of the molecule. Thromb. Res. 2, 55-70.

239. **STITT J.T. (1973).** Prostaglandin E1: Fever induced in rabbits. J. Physiol. 232, 163-179.

240. **STORCK J. (1979)** Le test Limulus. Son interet. J. Pharm. Belg. 34, 170-171.

241. **SULLIVAN J.D., (Jr), WATSON S.W. (1974)** Factors affecting the sensitivity of Limulus lysate. Appl. Microbiol. 28, 1023-1026.

242. **SULLIVAN J.D., (Jr) WATSON S. W. (1975)** Inhibitory effect of heparin on the Limulus test for endotoxin J. Clin. Microbiol. 2, 151.

243. **SUZUKI M., MIKAMI T., MATSUMOTO T., SUZUKI S. (1977).** Gelation of Limulus lysate by synthetic dextran derivatives. Microbiol. Inmunol. 21, 419-425.

244. **SVEEN K., HOFSTAD T., MILNER K.C. (1977)** Lethality for mice and chick embryos, pyrogenicity in rabbits and ability to gelate lysate from amoebocytes of Limulus polyphemus by lipopolysaccharides from Bacteroides, Fusobacterium and Veillonella. Act. Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 85, 388-396.

245. **TAKASHASHI S., YANO S., NAGAOKA Y., KAWAMURA K., MINAMI S. (1983).** A highly sensitive pyrogen test for antibiotics. I. Detection of trace amounts of endotoxin in injectable sodium ampicillin preparations. J. Pharm. Sc. 72, 739-742.

246. **THOMAS L. (1956).** Role of epinephrine in reactions produced by endotoxins of Gram negative

bacteria. I. Hemorragic necrosis produced by epinephrine in skin of endotoxin treated rabbits. J. Exp. Med. 104, 856-880.

247. **TONNESEN H. (1975)** Report at a meeting of the FIP working group "Limulus pyrogen testing" at Copenhagen.

248. **UEMURA J., MIZUSHIMA S. (1975)** Isolation of outer membrane proteins of E. coli and their characterization on polyacrylamide gel. Biochem. Biophys. Acta 413, 163-176.

249. **ULEVITCH R.J., COCHRANE C.G. (1978)** Role of complement in lethal bacterial lipopolysaccharide-induced hypotensive and coagulative changes. Inf. Immun. 19, 204-211.

250. **UNITED STATES PHARMACOPOEIA XX - NATIONAL FORMULARY XV (1980)** The United States Pharmacopoeial Convention, Inc. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville Md. 20852.

251. **UNITED STATES PHARMACOPOEIA XXI - NATIONAL FORMULARY XVI (1985)** The United States Pharmacopoeial Conven- -

tion, Inc. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville Md. 20852.

252. **URBASCHECK B., NOWOTNY A. (1968)** Endotoxin tolerance by detoxified endotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 650-654.

253. **VAN NOORDWIJK J., DE JONG Y. (1976)** Comparison of the Limulus test for endotoxin with the rabbit test for pyrogens of the European Pharmacopoeia. J. Biol. Standard. 4, 131-139.

254. **VAN NOORDWIJK J., DE JONG Y. (1977)** Comparison of the Limulus amoebocyte lysate (LAL) test with the rabbit test: false positives and false negatives. Dev. Biol. Stand. 34, 39-43.

255. **VAN NOORDWIJK J. (1979)** A comparison between the Limulus amoebocyte lysate test and the rabbit pyrogen test. J. Pharm. Belg. 34, 142-144.

256. **VAN NOORDWIJK J., KRUGER D. (1983)** Elimination of factors interfering with the LAL test. Pharmacopeia European Commision. Group of Experts No. 1L. Council of Europe.

257. **VARNEY R. F. (1962).** Pyrogens. Bull. Parent. Drug Ass. 16, 6-12.

258. **W.H.O. (1959)** Bol. OMS. 10, 241.

259. **WACHTEL R.E., TSUJII K. (1977).** Comparison of Limulus amoebocyte lysates and correlation with the United States pharmacopeial pyrogen test. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1265-1269.

260. **WARD P.A., HILL J.H. (1972)** Detection of lipopolysaccharide (LPS): an improved method for isolation of the Limulus extract. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 141, 898-900.

261. **WARD P.A., JOHNSON K.J. (1975)** Effects of endotoxins on serum mediators (complement, kinin, and clotting systems). En Schelessinger D. (ed) "Microbiology". Amer. Soc. Microbiol. Washington. pp. 327-329.

262. **WEARY M., WALLIN R.F. (1973).** The rabbit pyrogen test. Lab. An. Sc. 23, 677-681.

263. **WEARY M., DONOHUE G., PEARSON F.C., STORY K. (1980).** Relative potencies of four reference endotoxin standards as measured by the Limulus amebocyte lysate and USP rabbit pyrogen tests. Appl. Environ. Microbiol. 40, 1148-1151.

264. **WEARY M. (1986)** Pyrogen testing with the Limulus amebocyte lysate test. Pharmacy International 7, 99-102.

265. **WECKESSER J., DREWS G., MAYER H. (1979)** Lipopolysaccharides of photosynthetic prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol. 33, 215-239.

266. **WEISS, P.J. (1977).** Meeting of the Pharmaceutical Manufacturers Association. Naples.

267. **WEISS P.J. (1978)** Pyrogen testing. J. Parent. Drug Ass. 32, 236-241.

268. **WELCH, H., CALVERY, H.O., MC CLOSKY, W.T., PRICE, C.W. (1943).** Method of preparation and test for bacterial pyrogen. J. Amer. Pharm. 32, 65.

269. **WESTPHAL O., LUDERITZ O., BISTER F. (1952)** Uber die Extraktion von Bakterien mit phenol/ wasser. Z. Naturforsch. 7, 148-155.

270. **WESTPHAL O., JANN K. (1965)** "Methods of carbohydrate chemistry" Whistler R. L. ed. 5, Academic Press, New York. pp. 83-91.

271. **WHITE D.A., LENNARZ W.J., SCHNAITMAN C. A. (1972)** Distribution of lipids in the wall and cytoplasmic membrane subfractions of de cell envelope of Escherichia coli. J. Bacteriol. 109, 686-690.

272. **WILDFEUER A., HEYMER B., SCHLEIFER K.H., HAFERKAMP O. (1974).** Investigations on the specifity of the Limulus test for the detection of endotoxin. Appl. Microbiol. 28, 867-871.

273. **WILDFEUER A., HEYNER B., SPILER D., SCHEIFER K. H., VANEH E., HAFERKAMP O. (1975)** Use of Limulus assay to compare the biological activity of peptidoglycan and endotoxin. Z. Immunitatsforcsch Immunbiol. 149, 258-264.

274. **WOLFF S.M., MULHOLLAND J.H., WARD S.B. (1965)**

Quantitative aspects of the pyrogenic response of rabbits to endotoxin. J. Lab. Clin. Med. 65, 268-276.

275. **WOLFF S.M., KIMBALL H.R., PERRY S., ROOT R., KAPPAS A. (1967)** The biological properties of etiocholanolone. Ann. Intern. Med. 67,1268-1295.

276. **WOLFF S.M., KIMBALL H.R., MARSHALL J.R. (1973)** The effects of hydrocortisone and estrogen on experimental fever induced by etiocholanolone. J. Infect. Dis. 128, 243-247.

277. **YIN T. E., GALANOS C., KINSKY S., BRADSHAW R.A., WESSLER S., LUDERITZ O., SARMIENTO M.E. (1972)** Picograms sensitive assay for endotoxin: Gelation of Limulus polyphemus blood cell lysate ininduced by purified lipopolycaccharides and lipid A from Gram negative bacteria. Biochem. Biophys. Acta 261, 284-289.

278. **YOUNGNER J., FEINGOLD D.S., CHEN J. (1973)** Involvement of a chemical moiety of bacterial lipopolysaccharide in production of interferon in animals. J. Infect. Dis. 128, S227-S231.

279. **ZALDIVAR R. A., HANIG J.P. (1978)** Two differents modes of carrying rabbits for the antibiotics pyrogenicity test. J. Parent. Drug Ass. 32, 295-297.