DETECCION DE ENDOTOXINA EN INYECTABLES POR VIA ESPINAL

A. V. Aguirrezabal, M. Alvarz, T. Boada, R. De Miguel, M. Iribarren, A. Sanz, M. L. Vilella, M. J. Yurrebaso y C. Lacasa

Hospital Civil de Bilbao.

INTRODUCCION

Los pirógenos son principalmente endotoxinas producidas por los gérmenes gram (—), aunque también sustancias procedentes de bacterias gram (+) en concentraciones importantes, pueden ser pirogénicas (Dony, 1979), así como los virus (Linneman et al., 1974; Buynak et al., 1969) y hongos.

Las endotoxinas son los lipopolisacáridos procedentes de la pared externa de las bacterias gram (—) y son de naturaleza termoestable. Así, el LPS resiste el autoclavado y también resiste los disolventes orgánicos, los ácidos, el etanol y los líquidos esterilizantes (Elin y Wolff, 1973).

Los lipopolisacáridos, según las dosis inyectadas, son causantes de múltiples actividades biológicas que se resumen en la Tabla I (Lacasa, 1986; Ygartua et al., 1986).

La mayoría de estas actividades biológicas han sido descritas para unos pocos tipos bien conocidos de LPS (Salmonella y E. coli) en un número limitado de sistemas biológicos (ratones y conejos). Por esta razón es difícil tener una perspectiva clara de todas las actividades que pueden producir (Moreno, 1980). A pesar de los muchos efectos biológicos encontrados que producen las endotoxinas bacterianas, su papel en la patogenia está poco definido (Berry, 1975; Kass et al., 1973; Shands, 1975).

La importancia de los pirógenos en inyectables es bien conocida. Las bacterias vivas son más pirogénicas que las destruidas por el calor; pero el proceso de destrucción por calor libera sustancias pirogénicas rápidamente.

El crecimiento bacteriano en una solución fisiológica la hace más pirogénica, debido a un aumento de productos metabólicos y a otros factores (Personeus, 1973).

Diversos autores como Cooper y Harbert en 1975 indicaban, tras la administración intratecal de radiofármacos contaminados por pirógenos, que la vía intratecal es mil veces más sensible que la intravenosa a la endotoxina.

La Food and drug administration señaló en 1983 una dosis umbral pirogénica de 5 UE/Kg. de peso y por vía intratecal de 0,2 UE/Kg. de peso.

A principios de siglo parte del material utilizado en la punción lumbar era reutilizado, limpiándose con diferentes detergentes y esterilizándose posteriormente. Los casos de meningitis aséptica post-punción publicados hasta la fecha tienen como origen la introducción intratecal de detergentes; si bien se trataba de un cuadro relativamente frecuente durante las primeras décadas de siglo, en estos últimos decenios su incidencia es prácticamente nula (Tena et al., 1986). El último caso publicado es el de Bert y Laasberg en Anesthesiology en 1985. Este drástico descenso es debido al empleo sistemático de material desechable, lo que evita esta complicación.

En varios hospitales de Vizcaya ocurrieron en un corto período de tiempo once casos de Meningitis

TABLA I

ACTIVIDADES BIOLOGICAS DEL LPS DE ENTEROBACTERIAS (Lacasa, C., 1986)

Tóxicas

Actividad biológica

Aborto	Adipisia, afagia, diarrea
Agregación plaquetaria	Necrosis médula ósea
Citotóxica macrófagos	Disminución peso timo
Hipoferremia	Hipotensión
Toxicidad letal	Leucopenia y leucocitosis
Gelificación LAL	Aumento pirogenicidad BCG
Efecto Schwartzman	Aumento toxicidad BCG
Necrosis tumoral	Meningitis aséptica
Peritonitis aséptica	Pirogenicidad
Inhibición fibrinolisis	

No tóxicas

a) *Inmunológicas*

Capacidad adyuvante
Mitógena linfocitos B
Unión membranas celulares
Aumento fagocitosis
Antígeno específico de grupo
Síntesis IgG ratas recién nacidas
Activación policlonal células B
Activación macrófagos
Antígeno específico de especie
Antígeno timo-independiente

b) *Protección no específica*

Aumento resistencia
Protección frente a Rx
Tolerancia a la endotoxina
Aumento proteolisis

c) *Acción sobre proteínas séricas*

Unión a proteínas séricas
Activación compl. vía clásica
Activación compl. vía alternativa
Activación factor Hageman
Activación plasminógeno

d) *Inducción de sustancias biológicamente activas*

Activación sistema adenilciclasa
Aumento reactividad a epinefrina
Producción interferón
Factor activador de leucocitos
Producción de kinina
Síntesis de prostaglandinas
Liberación cortisol endógeno
Liberación hidrolasas lisosomales
Liberación vasoaminas

aséptica tras anestesia espinal por contaminación pirogénica del inyectable utilizado, Bupivacaína al 0,5 por 100 con glucosa al 8 por 100 (Arteta et al., 1986; Tena et al., 1986; Rodríguez Sasiain, 1986).

Todos los casos se produjeron después de punciones lumbares llevadas a cabo por diferentes anestesistas y bajo estrictas condiciones de asepsia. La edad de los pacientes oscilaba entre 16 y 64 años. El cuadro clínico fue muy semejante en todos ellos, así de 2-6 horas después de realizada la técnica anestésica apareció cefalea, fiebre que osciló entre 38 y 39° C, tiritona, rigidez de nuca, malestar general y en algunos casos obnubilación, agitación psicomotriz, vómitos y moderada fotofobia.

En la punción diagnóstica se obtuvo un líquido turbio y que fluía a mayor presión de lo normal, con leucocitos de predominio polimorfonuclear con cifras de no menos de un 99 por 100; los cultivos de líquido cefalorraquídeo fueron negativos en todos los casos, así como la observación directa al microscopio mediante tinción de gram. Tampoco crecieron gérmenes en los cultivos de anestésico local, ni en la jeringa, agujas y gasas.

El cuadro clínico cedió en 24-48 horas y a los dos meses, salvo la persistencia de una ligera cefalea en un paciente, todos los demás estaban asintomáticos, siendo la exploración normal (Arteta et al., 1986; Tena et al., 1986).

Para la detección de endotoxinas existen dos métodos por todos conocidos:

1. El análisis en conejos midiendo el efecto sobre la temperatura rectal.
2. Análisis LAL (Lisado de amebocitos de Límulus).

Si se utiliza como reactivo el conejo ha de tenerse en cuenta, como refiere Zinsser en 1971, que las reacciones pirogénicas son mucho mayores y más tóxicas (Wolff et al., 1965; Greisman y Hornick, 1969; Buskirk et al., 1965) para el hombre que para el conejo, tal como se observa en la Figura 1.

El origen del análisis de endotoxinas con LAL 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 tras la adición de cantidades de endotoxina en la hemolinfa de un invertebrado marino denominado Limulus polyphemus, que aparece de forma abundante en las aguas litorales atlánticas americanas.

Levin en 1985 explicaba el mecanismo de la coagulación por la endotoxina en el Limulus, cuyo esquema aparece en la Figura 2.

Cualquier sustancia que pueda desnaturalizar las proteínas o inhibir una reacción enzimática, deberá ser estudiada de forma particular antes de valorar su nivel de endotoxina por LAL; debido a que la acción 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 (Van Noordwijk y De York, 1977), como indica Cooper en 1985.

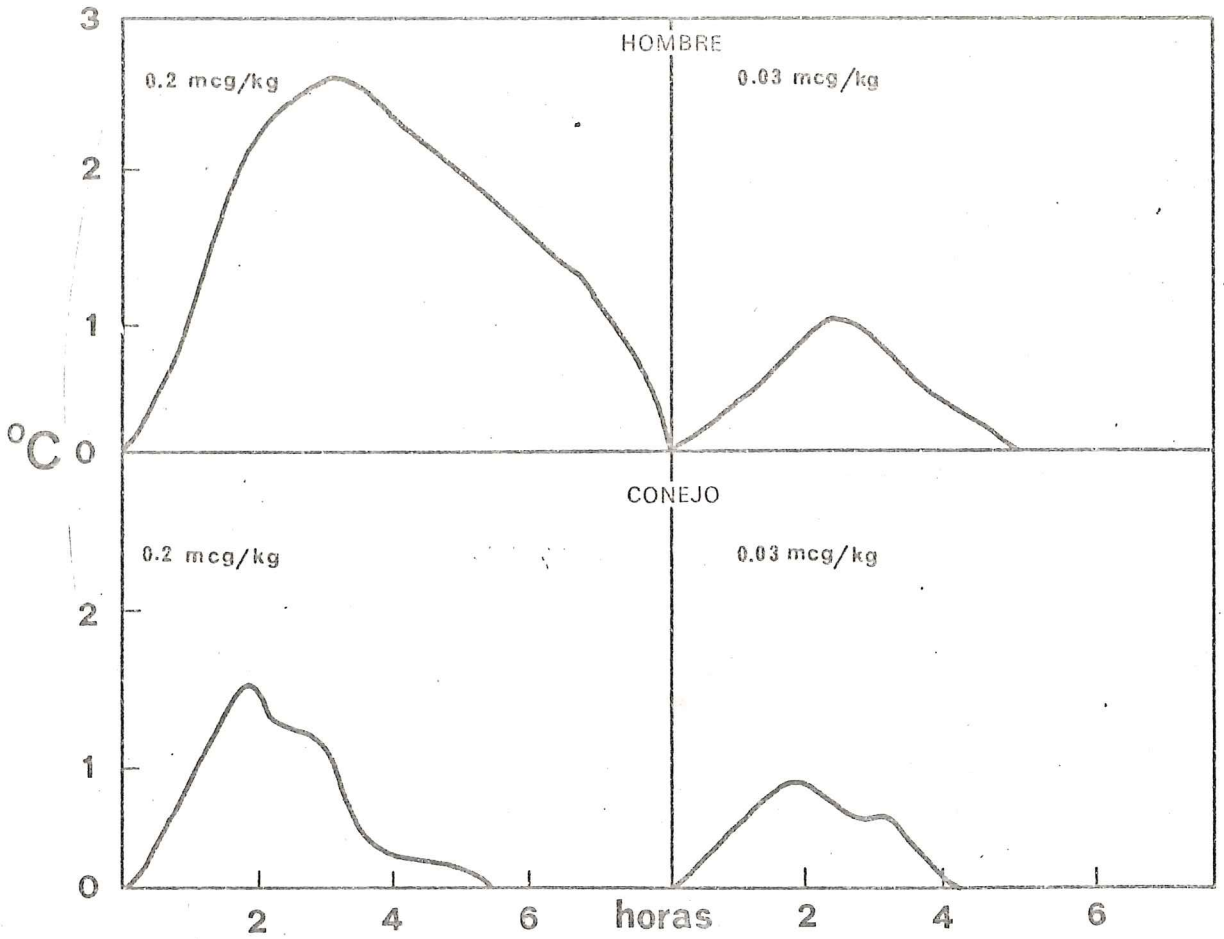


Fig. 1.—Fiebre producida por la inyección de pirógeno (endotoxina). El hombre es más sensible. Zinsser, 1971.

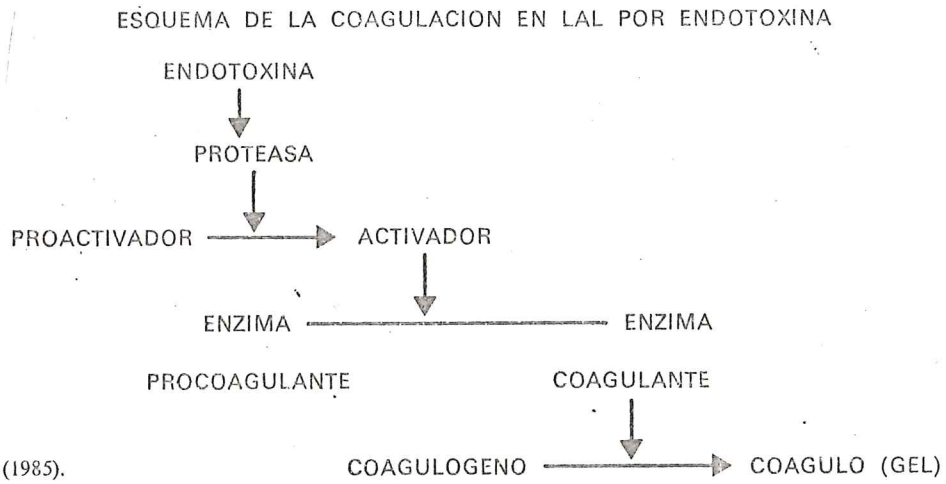


Fig. 2.—Levin, J. (1985).

La sensibilidad etiquetada se debe confirmar tal como indica la USP XXI, en 1985.

En muchos casos la interferencia de la gelificación se puede evitar ajustando el pH dentro de los niveles óptimos que oscilan entre 6 y 8 (Murata et al., 1976) o bien diluyendo la muestra (McCullough y Scolnick, 1976; Van Noordwijk, 1979).

Guilfoyle y Munson de la FDA en 1982 definían la máxima dilución válida para ser analizada:

$$MDV = \frac{C \text{ (Concentración del producto)} \times K \text{ (0,2 UE/Kg. vía intratecal)}}{\text{(Sensibilidad etiquetada lisado)} \times M \text{ (dosis máxima humana)}}$$

dosis/Kg/hora

En las Tablas II y III se indican algunas sustancias que se han mostrado compatibles e incompatibles con la reacción LAL (Lacasa, 1986).

OBJETO DEL TRABAJO

El objeto de este trabajo es:

1. Poner de manifiesto la importancia del test LAL en el análisis de inyectables intratecales, dando las pautas para su determinación, condiciones a cumplir y problemas en casos de incompatibilidades, que se han particularizado analizando dos lotes de bupivacaína hiperbárica, uno de los cuales fue responsable de los 11 casos de Meningitis aséptica en Vizcaya.
2. Describir las manifestaciones clínicas tras la administración de endotoxina por vía espinal, que ya ha sido descrito en la introducción.

MATERIAL Y METODOS

Material

- pHmetro Crison digital 501.
- Baño de agua termorregulado Precis-Term, Selecta 5-141.
- Agitador vibrador vortex Super-Mixer Lab-Line Instruments.
- Tubos pyrex de 5 y 15 ml. apirógenos.

Material desechable

- Jeringas de 1, 5 y 10 ml. marca Ico.

TABLA II

SUSTANCIAS COMPATIBLES CON LA REACCION LAL (Lacasa, C., 1986)

Sustancia	Dilución
Agua bidestilada	—
Bicarbonato sódico 1,4%, 4,2%, 8,4%	1/2, 1/5, 1/10
Cloruro cálcico 1%, 21,9%	—, 1/20
Cloruro magnésico 10%	1/5
Cloruro potásico 0,75%, 10%	—, 1/10
Cloruro sódico 0,9%, 10%	—, 1/10
Dextrano 40 al 10%	—
Dopamina 1%, 5%	—, —
Gluconato cálcico 10%	1/10
Glucosa 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 66%	—, —, 1/2, 1/6, 1/10, 1/10
Ioduro sódico 1%, 5%	—, 1/5
Manitol 10%	1/2
Procaína 1%	—
Polivinilpirrolidona 3,5%	1/10
Sorbitol 5%	—
Sulfato magnésico 15%, 33%	1/6, 1/10
Salicilato sódico 10%	1/10
Xilitol 5%	—

TABLA III

SUSTANCIAS QUE MODIFICAN LA REACCION DE GELIFICACION (Lacasa, C., 1986)

Sustancias inhibidoras

Alcohol bencílico 0,1%	Acetilcisteina
Acido ascórbico	Ampicilina
Bacitracina	Cloranfenicol
Bisulfito sódico	Clorhidrato de Tetraciclina
Citratos	Cisteina
Carbozocromo salicilato	Ciclicina lactato
Emulsiones grasas	EDTA
Edetato disódico	Estreptomicina
Fenol	Fluoresceina sódica
Glutation	Heparina
I-131 bromosulfaleína	I-131 rosa de bengala
Ketamina	Oxacilina sódica
Penicilina procaína	Prometazina
Polimixina B	Sulfisoxazol diolamina
Sulfobromoftaleína	Soluciones A.C.D.
Soluciones C.P.D.	Tiroxina
Zn-69m acetato de zinc	

Sustancias parcialmente inhibidoras	*Sustancias promotoras*
Lactosa 25%	Gelatina
Metilparaben	Tripsina
Propilparaben	Trombina
Ringer lactado en glucosa 5%	Tromboplastina

Reactivos

— Agua estéril para irrigación Uromatic, lote X5F04C1.
— Reactivo Pyrogent (Mallinckrodt), lote 5BH.
— Endotoxina E. coli 055:B5, lote 51796.
— Inyectable de bupivacaína ClH hiperbárica al 0,5 por 100, lotes 285 y 185.
— Inyectable de bupivacaína ClH al 0,5 por 100, lote VI. Ibys.

Técnica

Se ha realizado el test siguiendo las instrucciones de la firma fabricante del reactivo Pyrogent (R).

Todo el material usado debe ser estéril y apirógeno. El material de vidrio, tubos de ensayo, se colocan en un baño de ácido clorhídrico 1 N durante varias horas, lavándose abundantemente después con agua destilada y metiéndose en la estufa a 250° C durante 30 minutos por lo menos, USP XX (1980).

El material de plástico debe esterilizarse mediante óxido de etileno, como indica Moreno (1982).

El control (+) debe realizarse por lo menos con una concentración doble de la sensibilidad comprobada del lisado.

Cuando el período de incubación para cada tubo ha terminado se saca cuidadosamente y se invierte 180° para comprobar la formación de gel. Aunque en las instrucciones del test sólo considera positivo la formación de un gel firme, comunicaciones de otros autores como Cooper y Harbert, 1975; Hochstein, 1985 y Levin, 1985, indican que los resultados que no son gel firme sino floculación y aumento de viscosidad pueden considerarse positivos; esto aumenta la sensibilidad del análisis, pero dicha interpretación sería menos definitiva y nos ha obligado a definir tres grados de positividad (Lacasa, 1986):

\+ Aumento ligero de viscosidad.
\++ Aumento notable de viscosidad.
\+++ Gel firme.

Métodos

1. Se compararon diferentes diluciones de endotoxina estándar con bupivacaína y diluciones de agua más endotoxina, con objeto de ver si había alguna interferencia y de verificar la sensibilidad del lisado.

2. Se analizaron los lotes de bupivacaína hiperbárica al 0,5 por 100 185 y 285 para detectar la existencia de posible endotoxina.

RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis de endotoxina en conejos de los inyectables de bupivacaína al 0,5 por 100 hiperbárica, lote 285, causante de las meningitis asépticas, dio negativo según comunica Rodríguez Sasiain en 1986.

Los resultados del análisis por LAL aparecen en las Tablas IV y V. En la Tabla IV se encuentran los resultados del análisis de diferentes diluciones de endotoxina estándar con agua, lo que verifica la sen-

TABLA IV

RESULTADOS DE LAL "PYROGENT" CON BUPIVACAINA 0,5% Y AGUA CONTAMINADOS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ENDOTOXINA *E. coli* 055:B5

Contaminación	UE/mL	Bupivacaína (0,5%)	Agua
Endotoxina *E. coli* 055:B5 añadida	0,5	+++	+++
	0,25	+++	+++
	0,12 ( )	++	++
	0,06 (1/2)	+	+
	0,03	—	—

TABLA V

RESULTADOS DE LAL "PYROGENT" CON BUPIVACAINA 0,5% HIPERBARICA: GLUCOSA 8% LOTES: 185 Y 285 A DISTINTAS DILUCIONES

Concentración %		Resultados LAL		
Bupivacaína	Glucosa	Dilución	Lote 185	Lote 285
50×10^{-2}	8	0	—	+++
25×10^{-2}	4	1/2	—	+++
$12{,}5 \times 10^{-2}$	2	1/4	—	+++
$62{,}5 \times 10^{-3}$	1	1/8		+++
50×10^{-3}	0,8	1/10		+++
$37{,}5 \times 10^{-3}$	0,6	1/15		+++
25×10^{-3}	0,4	1/20		+++
$18{,}7 \times 10^{-3}$	0,3	1/30		+++
$12{,}5 \times 10^{-3}$	0,2	1/40		+++
10×10^{-3}	0,16	1/50		+++

sibilidad etiquetada del LAL: 0,12 UE/ml. Se hicieron cuatro repeticiones de cada muestra.

Al comparar estos resultados con los de las diluciones de bupivacaína 0,5 por 100 con endotoxina, se observa que la bupivacaína es compatible con el análisis LAL. El análisis se hizo únicamente frente a bupivacaína, ya que teníamos numerosas referencias acerca de la compatibilidad de la glucosa al 5 y 10 por 100 (Fumarola et al., 1975). El pH de las ampollas de bupivacaína hiperbárica al 0,5 por 100 es de 4,9.

En la Tabla V se observa la ausencia de gel en el lote 185 de bupivacaína 0,5 por 100 hiperbárica, mientras que en el lote 285 aparece gel firme hasta la dilución 1/50 que se realizó, lo que indica que el contenido de endotoxina es de 18 UE por lo menos, teniendo en cuenta que la sensibilidad del lisado es de 0,12 UE/ml. La dosis umbral pirogénica, según la FDA, es de 0,2 UE/Kg., lo que para un hombre de 60 Kg. resulta 12 UE de endotoxina.

El análisis por LAL del lote 285 de bupivacaína al 0,5 por 100 hiperbárica es claramente positivo, mientras que es negativo en conejos.

Otros autores corroboran este hecho, como Cooper et al. (1971), que analizaron endotoxina de E. coli en una concentración 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 negativo en conejo a concentración de 600 pg/ml. Autores como Eibert (1972), Fussellier (1977), Mascoli (1979) y Pericin (1979) concuerdan en la mayor sensibilidad del análisis LAL, e indican que éste 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.

Cooper et al. en 1971 indican que el LAL es unas diez veces más sensible que el análisis de pirógenos en conejos.

En la Tabla VI se compara la sensibilidad de los análisis LAL y conejos a endotoxinas extraídas de gram (—).

Lacasa en 1986 ha sintetizado las ventajas e inconvenientes de los análisis LAL y conejos.

TABLA VI

NIVELES DE ENDOTOXINA PROCEDENTE DE GERMENES GRAM NEGATIVOS DETECTADA POR ANALISIS LAL Y EN CONEJOS (Lacasa, C., 1986)

Bacteria	Cepa	Sensibilidad	
		LAL (+) ng/mL	Conejo (+) ng/Kg
E. coli	0127:B8	2 0,03-0,3	5 1
	0111:B4	10 0,4-0,5	50
	055:B5	0,06-0,39 1 0,1-0,25	1
	026:B6	—	<1
Klebsiella pneumoniae	K67	5 >20	5 0,5
Pseudomonas aeruginosa	P13	1	—
Salmonella minnesota	R595	0,5 5×10^{-7}	
	S265	5×10^{-8}	
Salmonella typhi	TY58	1	0,5

CONCLUSIONES

1. El ensayo LAL es más sensible y útil para el análisis de endotoxina en inyectables de administración espinal que el ensayo en conejos.
2. Es necesario establecer previamente la compatibilidad del producto a analizar con el LAL.
3. Es preciso una mayor regulación legal de fórmulas magistrales y extender este análisis.

BIBLIOGRAFIA

1. Alsberg, C. L.; Clark, E. D. (1908): «The blood clot of Limulus polyphemus». *J. Biol. Chem.*, 5: 523.
2. Arteta, M.; Martínez Bourio, R.; Sáez de Eguilaz, J. L.; Aguilera L.; Nieva, R. (1986): «Meningitis química como complicación tras anestesia intradural». Comunicación Congreso Nacional de Anestesia.
3. Berry, L. J. (1975): «Metabolic effects of endotoxin». En D. Schlessinger (ed) «Microbiology». *Amer. Soc. Microbiol.*, pp. 315-319. Washington D. C.
4. Bert, A. A.; Laasberg, L. H. (1985): «Aseptic meningitis following spinal nesthesia». A complication of the past? *Anesthesiology*, 62: 674-677.
5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. Cooper, J. F.; Harbert, J. C. (1975): «Endotoxin as a cause of aseptic meningitis after radionuclide cisternography». *J. Nuclear Med.*, 16: 809-813.
9. 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.
10. Cooper, 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.*, pp. 241-249. New York.
11. Cooper, J. F.; Pearson, S. M. (1977) «Detection of endotoxin in biological products by the Limulus test». *Dev. Biol. Stand.*, 34: 7-13.
12. Dony, J. (1979): «Les endotoxins et leurs effects biologics». *J. Pharm. Belg.*, 34: 127-183.
13. Eibert, J. (1972): «Pirogen testing: Horseshoe crabs vs». *Rabbits. Bull. Parenter. Drug Assoc.*, 26: 253-260.
14. Elin, R. J.; Wolff, S. M. (1973a): «Nonspecificity of the Limulus amebocyte lysate test: positive reactions with polynucleotides and proteins». *J. Infect. Dis.*, 128: 349-352.
15. 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.
16. Fussellier, M.; Lagodsky, H.; Benard, M.; Brin, M. A.; Deschhamps, F.; Maignan, M.; Merlín, L.; Perrault, G.; Rinjard, P.; Storck, J.; Wachter, A. (1977): «Le test Limulus». *R. Sci. Tech. Pharm.*, 6: 293-305.
17. Freisman, S. E.; Hornick, R. B. (1969): «Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin». *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131: 1154-1158.
18. 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, Inc.*, pp. 79-90. New York.
19. 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.*, pp. 221-239. New York.
20. 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, pp. 291-294, London.
21. Lacasa, C. (1986). Tesis doctoral.
22. Levin, J. (1985): «The history of the development of the Limulus amebocyte lysate tst.». 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.*, pp. 3-28. New York.
23. 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.
24. Loeb, L. (1902): «On the blood lymph cells and inflamatory processes of Limulus». *J. Med. Res.*, 7: 145.
25. Mascoli, C. (1979): «Limulus amebocyte lysate (LAL) test for detecting pyrogens in parenteral injectables and medical devices». *J. Pharm. Belg.*, 34: 145-155.
26. McCullough, K. Z.; Scolnick, S. A. (1976): «Effect of semisynthetic penicillins on the Limulus lysate test». *Microbiol. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9: 856-858.
27. Moreno, E. (1980): «Purificación, chemical characterization and biological activity of Brucella lipopolysaccharide». Doctoral Thesis. University of Wisconsin. Madison.
28. Moreno, J. L. (1982): Comunicación personal.
29. Murata, H.; Kobayashi, M.; Lio, M.; Yamada, H.; Chiba, K.; Matsui, K. (1976): Sensitivity of the Limulus test and inhibitory factors in the radiopharmaceuticals». *J. Nucl. Med.*, 17: 1088.
30. Pearson, F. C.; Weary, M. E.; Bohon, J.; Dabbah, R. (1982): «Relative potency of "environmental" endotoxin as measured by the Limulus amebocyte lysate 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.* pp. 65-67. New York.
31. Pearson, F. C. (1985): «A comparison of the pyrogenicity of environmental endotoxins and lipolysaccharides saccharides». En ten Cate, J. W.; Buller, H. R.; Sturk, A.; Levin, J. (eds): «Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance, and detection with Limulus amebocyte lysate test». *Alan R. Liss Inc.*, pp. 251-263. New York.
32. Pericin, C. (1979): «In vitro determinations of pyrogenicity by means of the Limukus test». *J. Pharm. Belg.*, 34: 166-167.
33. Personeus, G. R. (1973): «Pyrogen testing of parenteral pharmaceutical». En Cooper, M. (ed): «Quality control in the pharmaeutical industry». Academic Press, Inc. New York, pp. 239-268, test for detecting pyrogens in parenteral injectables and medical devices. *J. Pharm. Belg.*, 34: 145-155.
34. Rodríguez-Sasiaín (1986): Comunicación personal.
35. Shands, J. W. (1975): «Endotoxin as a pathogenic mediator of Gram negative infection». En Schlessinger, D. (ed.): «Microbiology». *Amer. Soc. Microbiol.*, pp. 330-335. Washington.
36. Tena, L.; Rodríguez, T.; Ortiz, V.; Seoane, A. (1986): «Meningitis aséptica tras anestesia espinal». Congreso Nacional Anestesia.
37. United States Pharmacopoeia XX-National Formulary XV (1980): The United States Pharmacopeial Convention Inc.». 12601 Twinbrook Parkway, Rockville Md. 20852.
39. 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.
40. Van Noordwijk, J. (1979): «A comparison between the Limulus amoebocyte lysate test and the rabbit pyrogen test». *J. Pharm. Belg.*, 34: 142-144.
41. 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.
42. Ygartua, P.; Lacasa, C.; Vega, F. A. (1986): «Pirógenos, naturaleza y actividad biológica». *C.I.F.*, 5: 90-101.
43. Zinsser (1971). Microbiología, 4 ed.