

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Quimica



"PRUEBA DE LIMULUS: UNA ALTERNATIVA A LA PRUEBA DE
DETERMINACION DE PIROGENOS EN CONEJOS. DISCUSION
DE SU APLICACION PARA VALORACION CUANTITATIVA"

INFORME DE LA PRACTICA PROFESIONAL
Que para obtener el titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a
ANA MARIA LOPEZ CAMPOS



1 9 8 7



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

			<u>Página</u>
INDICE			
ABREVIATURAS			1
CAPITULO	I	INTRODUCCION	2
CAPITULO	II	INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA: ANTECEDENTES	3
CAPITULO	III	PARTE EXPERIMENTAL	28
		A. Calificación de la prueba LAL	31
		B. Muestras que deben tratarse para evitar inhibición en la prueba LAL	33
		C. Resultados	37
CAPITULO	IV	DISCUSION DE RESULTADOS	64
CAPITULO	V	RESUMEN	67
CAPITULO	VI	CONCLUSIONES	68
CAPITULO	VII	BIBLIOGRAFIA	69
CAPITULO	VIII	APENDICE	72

ABREVIATURAS

LAL	Lisado de Amebocitos de Limulus (Limulus Amebocyte Lysate)
BGN	Bacterias Gram Negativas
LPS	Lipopolisacáridos
BSA	Albúmina Sérica Bovina
HSA	Albúmina Sérica Humana
<u>E.c.</u>	<u>Escherichia coli</u>
NEM	N-etilmaleimida
BOB	Bureau of Biologics
°C	Grados Centígrados
ml	Mililitros
g	Gramos
µg	Microgramos (10^{-6} g)
ng	Nanogramos (10^{-9} g)
pg	Picogramos (10^{-12} g)
LD	Dosis Letal
moos.	Microorganismos
USP	Farmacopea de los EE.UU. (United States Pharmacopeia)
FNEUM	Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos
uma	Unidad de masa atómica
FR	Registros Federales (Federal Register)

CAPITULO I

INTRODUCCION

Hoy como todos los días de este siglo, se esta trabajando en las diferentes áreas científicas para descubrir nuevos recursos y mejorar y optimizar las técnicas en uso. El control de calidad farmacéutico no es una excepción y los hallazgos respecto a la aglutinación de amebocitos de Limulus lisados (células sanguíneas de este género de cangrejo), bajo la presencia de endotoxinas bacterianas, que constituyen la principal causa de pirógenos, plantea una alternativa a la técnica de determinación de pirógenos en conejos.

Este trabajo tiene el propósito de dar a conocer a los estudiantes y profesionistas de la Química Farmacéutica lo que es LAL (Limulus Amebocyte Lysate), en la Industria Químico Farmacéutica de nuestros días, sus ventajas y desventajas al ser comparado contra la determinación de pirógenos en conejos, y finalmente dejar en la memoria del lector la existencia y posibilidades de uso de esta técnica que considero un verdadero avance tecnológico.

CAPITULO II

INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA: ANTECEDENTES

I. Generalidades

La palabra pirógeno proviene de las palabras griegas PYROS, que significa fuego y GENE que significa producir, engendrar; por lo que el sentido literal es "productor de fuego". Este nombre se ha otorgado principalmente a un grupo de sustancias que son producidas por microorganismos y que provocan una alza en la temperatura corpórea del organismo infectado o huésped.

Las endotoxinas bacterianas en niveles superiores a los 100 pg presentes en soluciones parenterales, dan como resultado fiebre en pacientes a quienes se les administran. Es obligación de la industria farmacéutica que produce (ya sea fabricación o maquila), el asegurarse que los productos parenterales no sean pirogénicos y que los métodos de laboratorio para detectarlos sean eficaces. Por más de 30 años se ha usado la prueba oficial (USP; FNEUM) de detección de pirógenos en conejos, siendo ésta, laboriosa, costosa y sujeta a la variabilidad característica de todos los sistemas biológicos complejos. La prueba está basada en la consideración de que la dosis umbral de endotoxinas pirogénicas, para el hombre y el conejo son equivalentes; Grisman y Hormick (1969) ⁽¹⁾ informaron de la similitud de la respuesta a la dosis umbral de endotoxinas, pero también señalaron que con niveles más altos de endotoxina la relación dosis-respuesta era considerablemente mayor en el hombre ⁽¹⁾.

La prueba LAL (Lisado de Amebocitos de Límulus), está descrita en la literatura como el método más sensible para detectar endotoxinas bacterianas. El origen de la prueba es la coagulación sanguínea sufrida por el Límulus polyphemus (cangrejo herradura), cuando éste está sujeto a invasión bacteriana.

NOTA: La prueba consiste en la combinación de la muestra problema con el Lisado de Amebocitos, incubando a 37°C y verificando la evidencia de un coágulo. Weary y Baker (1977)(24), demostraron que la dosis mínima pirogénica en conejo era 10 ml/kg de peso de endotoxina estándar de E.c. suministrada en la vena marginal de la oreja del conejo con una concentración de 0.1 ng/ml (100 pg/ml).

Estos autores consideraron a 0.05 ng/ml ó 50 pg/ml de endotoxina estándar de E.c. como el criterio de "pasa" o "falla" en la prueba de pirógenos por LAL.

El primero en realizar trabajos sobre LAL fue el Dr. Frederick Bang (1956)(2), quien originalmente descubrió que las células sanguíneas del cangrejo sufrían coagulación al ser inyectado éste con bacterias Gram negativas (BGN), observando que la muerte era producida por tal coagulación, más que por una infección sistémica. Debido a la observación de este fenómeno, efectuó estudios separando las células sanguíneas del plasma y mezclándolas con BGN, observando que solamente las células sanguíneas (amebocitos) eran los responsables de la formación de agregados.(2)

II. Estudios realizados sobre el lisado y forma de preparación actual

El Lisado de Amebocitos de Límulus es un extracto acuoso de células sanguíneas del cangrejo Límulus polyphemus (Levin y Bang (1968) (3). En 1973 Solum(3) tuvo éxito en la purificación del coagulógeno del lisado de Límulus, el cual reportó tenía un peso molecular de 23,100 ± 900 umas.

Esta proteína se sabe que participa en la formación del gel inducido por BGN⁽⁴⁾. También se ha reportado que una proteína llamada coagulógeno⁽⁴⁾, fue altamente purificada del lisado de amebocitos del cangrejo japonés (Tachypleus tridentatus) en 1976⁽³⁾, por un método similar al usado para el lisado de Limulus Polyphemus; este material fue aislado de una banda única por electroforesis en gel analítico a pH 3.2 con SDS (dodecil-sulfato de sodio), tanto en ausencia y presencia de 2-mercaptoetanol. El 90% fue de proteína coagulable, obteniéndose cerca de 40 mg de ésta, a partir de 10 ml del lisado de amebocitos. El coeficiente de sedimentación del coagulógeno purificado fue de 2.6 S y el peso molecular estimado fue de 15,300 umas y de 19,500 umas por análisis electroforético en gel de acrilamida con SDS. Esta discrepancia aparentemente se debe a la movilidad dada por la naturaleza básica de la proteína en electroforesis. El punto isoeléctrico de la proteína se presentó a un pH de 10.0 ± 0.2 . El coagulógeno consta de un total de 215 aminoácidos y contiene altos niveles de aminoácidos básicos, los cuales constituyen un poco más del 16%.

La extracción de la sangre del cangrejo se efectúa con una aguja de 13 x 18 mm, de la cavidad cardiaca, en la unión del dorso con el cefalotorax⁽⁵⁾. La forma de preparar las células puede ser por diferentes métodos:

- Método de Reinhold y Fine (1971)⁽⁵⁾. La sangre del cangrejo es recolectada en tubos conteniendo solución acuosa del NaCl al 3% con N-etilmaleimida al 0.125%, se centrifuga en recipientes de plástico siliconizado durante 20 minutos a 800 rpm, el paquete celular se lava con la misma solución y el tercer lavado se hace con solución acuosa de NaCl al 3% sin NEM. El paquete celular se resuspende en agua destilada en una proporción equivalente a cinco

veces el volumen del mismo, dejándolo reposar toda la noche a 5°C.

- Método modificado de Reinhold y Fine por Peter A. Wead y Jeffrey H. Hill (1972) (5). Es igual al anterior hasta donde el paquete celular se resuspende en agua destilada en una proporción equivalente a cinco veces el volumen del mismo, pero tomando inmediatamente alicuotas de 150 ml de la suspensión de amebocitos y sometién^{do}la posteriormente a ruptura de las células en un homogenizador adecuado y una velocidad de 40,000 rpm durante cinco minutos; se repite el procedimiento una vez más. Durante la homogenización el envase se sumerge continuamente en agua fría. Este procedimiento termina con la ruptura de todas las células a juzgar por el microscopio, el homogenizado se centrifuga a 1,500 rpm por diez minutos. Las células pueden congelarse en alicuotas de 10 ml cada una a -70°C.
- Método de Jorgensen y Smith (1973) (4). La sangre se recolecta en tubos de centrífuga siliconizados conteniendo 100 ml de solución de N-etilmaleimida al 0.125% y NaCl al 3%, se centrifuga, el sobrenadante se descarta y las células se resuspenden en agua destilada libre de pirógenos y se mantienen a 5°C con agitación. Por último, se centrifuga y el reactivo así preparado se puede almacenar por algunas semanas a 5°C o también se puede liofilizar y congelar.
- Método a partir de Tachypleus tridentatus (36). La sangre se recolecta y se deposita en recipientes de vidrio siliconizado conteniendo solución acuosa NaCl al 3% a temperatura ambiente, las células se resuspenden en solución acuosa amortiguadora de Tris-HCl 0.05 M en CaCl₂ 0.002 M y NaCl 0.154 M a pH 7.2, la solución se congela y descongela y se centrifuga a 2,500 rpm por 30 minutos.

Se ha demostrado experimentalmente que los preparados de amebocitos varían en su sensibilidad, dependiendo de las diferentes estaciones del año en que son recolectados los cangrejos, así como las diferentes regiones e inclusive de un año a otro.

Woods Hole (4). En el verano de 1972, demostró que el preparado de LAL gelificaba con 1 ng/ml de endotoxina y el preparado idénticamente en el verano siguiente no produjo gel ni con 5 ng/ml de la misma endotoxina.

Sullivan y Watson (1974) (4). Demostraron la presencia de un inhibidor de la gelificación y establecieron que éste podría ser extraído con cloroformo, eter etílico, tetracloruro de carbono, tolueno y hexano siendo el más efectivo el cloroformo. Por otra parte, se incrementa la sensibilidad del lisado tratado con cationes divalentes como por ejemplo: Ca^{++} , Mg^{++} y Mn^{++} en una concentración 0.05 M en adición de NaCl 0.1 M que elimina la turbidez.

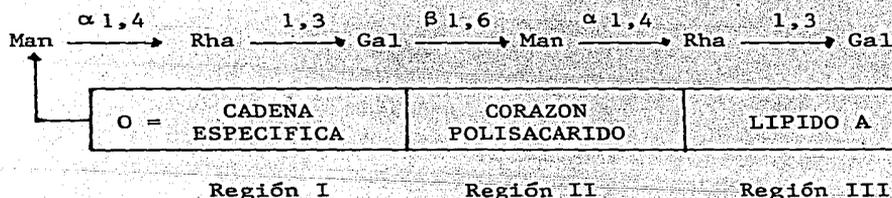
El BOB (Bureau of Biologics) en 1977 (30). Introdujo un lisado como estándar de referencia estableciendo la sensibilidad de cada lote de lisado comercial. También detallaron los lineamientos de procedimiento de laboratorio para comparar cada lote de lisado. La sensibilidad de cada lote de lisado, debe ser establecida usando el método descrito en la publicación del FR de 1973 (29), así como también en la publicación del citado documento en 1978 (31).

III. Endotoxinas

Las endotoxinas son compuestos de alto peso molecular asociados con la parte externa de la membrana de bacterias Gram negativas (BGN) y son los pirógenos de más importancia

en la industria farmacéutica. Están íntimamente asociadas con la membrana de la célula bacteriana y se encuentran comúnmente en el medio ambiente, ya que cuando las bacterias sufren autólisis las endotoxinas son liberadas. Las endotoxinas sin purificar contienen proteínas, lípidos y carbohidratos, y las endotoxinas puras son lipopolisacáridos (LPS). Las endotoxinas son compuestos estables al calor, que resisten a ciclos de esterilización con vapor. Las endotoxinas son inactivadas por exposición al calor seco, condiciones ácidas y condiciones alcalinas (36).

La endotoxina aislada de la membrana de las BGN contiene tres regiones químicas; la interna está compuesta de lípido A, la cual está enlazada al corazón central del polisacárido (36), que a su vez se encuentra unida a una cadena específica.



donde:

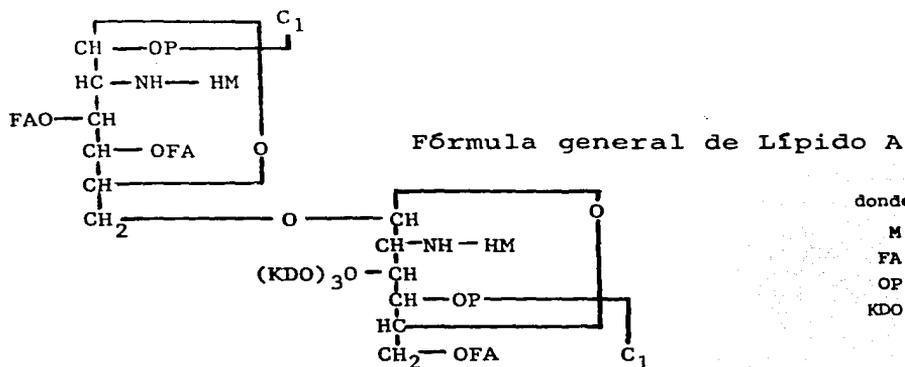
Man = Manosa
Rha = Rhamnosa
Gal = Galactosa

Estructura de la Cadena O-específica en el LPS de *S. Newington* (33).

Recientes investigaciones han demostrado que toda la actividad biológica de la endotoxina reside en la porción lipídica de la misma. Esta porción lipídica (lípidio A) de la endotoxina es la responsable de la toxicidad⁽³⁹⁾ de las BGN, por otra parte, la cadena O específica es la responsable de los miles de serotipos existentes, mientras que el corazón o porción polisacárida es marcadamente uniforme en la mayoría de los diversos grupos de BGN.

El lípidio A está asociado con disacáridos de glucosamina, los cuales son fácilmente sustituidos con enlaces amida y ésteres de ácidos grasos. El ácido graso, más comunmente enlazado, es el ácido 3-hidroxi mirístico (14 C) y se encuentra unido al lípidio en cuestión mediante un enlace amido. El enlace éster de ácidos grasos tiende a ser más variable, incluyendo a ácidos como capríco, laúrico, mirístico, palmítico y esteárico, siendo estos ácidos grasos saturados de cadena lineal. La remoción del enlace éster y de residuos de ácidos grasos, puede llevarse a cabo por tratamiento con una base diluida, lo cual disminuye la actividad biológica del lípidio A; inclusive un tratamiento con NaOH 0.25 N por 30 minutos a 56°C puede ser una forma de despirogenizar algunos materiales y equipos. En el lípidio A hay enlaces glucosídicos 1,6 que van del Carbono 1 (C₁) de una unidad al Carbono 6 (C₆) de la unidad adyacente, también tiene disacáridos unidos por enlaces fosfodiéster 1,4 entre el C₁ de una molécula y el C₄ de la molécula adyacente.

Preparaciones de lípidio A han inducido pirogenicidad, activación de complemento efecto adyuvante y B-linfocito mitogenicidad entre otros fenómenos⁽³³⁾.



donde:

M = ácido mirístico
 FA = ácido graso
 OP = enlace de fosfato
 KDO = cetodesoxioctonato (39)

Típicamente el lípido A está enlazado a núcleos heteropolisacáridos por medio del cetodesoxioctonato (KDO). El polisacárido actúa como un soluto acarreador de la porción lipídica, haciéndola hidrosoluble. Los oligosacáridos son sustituidos con antígenos O-específicos somáticos, lo que determina la especificidad del LPS; comúnmente el antígeno O-específico puede contener didesoxiazúcares, aminoazúcares, ácido urónico y o-metil derivados de azúcares (pentosas, hexosas y aminohexosas), estos aminoazúcares dan la diferenciación de los LPS. Esta secuencia única, es la responsable de la diversificación serológica universal encontrada en BGN, definida por Kauffman-White. Esta característica permite la identificación de alrededor de 1,000 serotipos de Salmonella sp. y aproximadamente 100 serotipos de E.coli, considerando únicamente los antígenos somáticos (36).

Actualmente existen cuatro endotoxinas que pueden ser usadas como estándares y provienen de: Shigella disenteriae, Escherichia coli 0113; H10: KO, Escherichia coli 055:B5 y Salmonella equi.

Shigella disenteriae: D. Al Davis (26) en el Departamento de Investigación Microbiológica de Boston, Inglaterra, en 1956, preparó una solución con alta potencia pirogénica a partir de Shigella disenteriae; esta preparación fue seleccionada porque había sido altamente purificada y caracterizada quí-

micamente; se extrajo con dietilenglicol y se sometió a purificación por precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Los fosfolípidos se eliminaron con solución ácida de eter-etanol y el complejo proteína polisacárido se separó por centrifugación, sedimentando entre 25,000 y 105,000 g. El material resultante contenía aproximadamente 4.5% de nitrógeno y 0.8% de fósforo y aparecía homogéneo cuando se sometía a electroforesis y ultracentrifugación. Esta preparación tiene un peso molecular de 1.0×10^7 umas una LD₅₀ de 80 ng en ratones. En dosis de 1 µg de endotoxina produce en conejos aglutininas a S. disenteriae y cuando se les inyecta en dosis de 0.003 µg causa respuesta febril⁽²⁶⁾.

El estándar se recibió en el Instituto Nacional de Investigación Médica de Londres, en marzo de 1957, siendo el primer estándar (ST) de endotoxina⁽²⁶⁾. Posteriormente, se demostró que existía gran variabilidad en las cantidades de endotoxina requeridas para provocar fiebre en conejos⁽²⁶⁾; Weary y colaboradores demostraron que se requirieron 3.28 ng de ST/kg de peso para producir un incremento de temperatura de 0.46°C. Adicionalmente Simon⁽²⁷⁾ encontró que se requería una dosis de 75 ng/kg para provocar fiebre en conejos. En 1981 Garratl y colaboradores demostraron que la respuesta pirogénica en pruebas realizadas con conejos, falla con 2 ng/kg de peso usando este estándar.

Escherichia coli 0113; H10: KO, (E.c.): Rudback (1976) preparó un lote primario de E.c. usando el método de Westphal de extracción con fenol; este estándar cumplía los requerimientos del BOB. Para la evaluación de E.c. se tomó en cuenta LD₅₀ y la Actividad Mínima Pirogénica (MPA), los resultados indicaron una variación significativa no deseada, aún cuando en un estudio comparativo de E.c. con una endotoxina de Klebsiella realizando la prueba por LAL demostró que E.c. era seis veces más potente⁽³⁶⁾.

Escherichia coli 055:B5: La endotoxina de esta bacteria es extraída por el método de Boivin (tricloroacético) o por extracción de Westphal y que comercialmente es utilizada por los laboratorios Difco de Detroit, Michigan. La HIMA (The Health Industry Manufacturers Associatons) seleccionó E. coli 055:B5 como estándar, después de un estudio comparativo en una sección cruzada de pruebas de pirógenos en conejos y LAL; el estudio concluyó con 95% de confianza a una concentración de 98 pg/ml administrada a razón de 10 ml/kg de peso; de esta forma, HIMA se vió forzada a establecer 0.1 ng de endotoxina como el estándar de referencia para comparación de la prueba (ver Tabla 1 para la comparación química de E.c. y E. coli 055:B5)⁽³⁶⁾.

Salmonella abortus equi: La endotoxina de S. abortus debe ser extraída usando el procedimiento Westphal con fenol-agua y reextraída con fenol, cloroformo y éter de petróleo. Esta extracción se sujeta a electrodiálisis para remover el material catiónico y la acidez se neutraliza con trietilamina; esta forma soluble de LPS se precipita con CaCl_2 , se centrifuga y se electrodializa una vez más, la forma ácida resultante se neutraliza con NaOH y se convierte en una sal uniforme. Esta sal es soluble en agua con un coeficiente de sedimentación de 105 S, una vez purificada, es distribuida como Novo Pyrexal por Hermal Chemie, Kurt Hermann Hamburg, West Germany. La composición química se presenta en la Tabla 2. Comparando la composición con E.c. y E.coli 055:B5 en la Tabla 1, se observa que el Novo Pyrexal está más purificado que las dos preparaciones de E.coli. Es interesante hacer notar, que el contenido de ácidos grasos del lípido asociado es marcadamente similar a E.coli 055:B5 y S. abortus equi. Este último contiene aproximadamente 20% más de lípido A asociado al ácido β -3-hidroximiriístico y debido a que éste es el responsable de la actividad biológica, se espera que el

Novo Pyrexal sea más activo que los tres estándares anteriores. En información reportada por Weary⁽⁴⁾, se indica que tanto en la prueba de LAL como en la de conejos, la actividad se da significativamente más pronunciada con el Novo Pyrexal. Estos autores reportan que se requieren solamente 0.56 ng/kg para producir un resultado de "falla" en la prueba de pirógenos en conejos. Galanos⁽¹²⁾ reportó un incremento de 1°C con 1.0 ng de Novo Pyrexal/kg. Galanos y colaboradores reportaron a S. abortus equi como el estándar de elección por las razones anteriores.⁽³⁶⁾

Tanto el cetodesoxioctanato (KDO), los carbohidratos totales, la hexosamina y los ácidos nucleicos son comparables en E.c. y E.coli 055:B5. Es interesante observar en las Tablas 1 y 2 que los esterés de ácidos grasos y los esterés de ácidos grasos combinados con amida, son semejantes en E.coli 055:B5 y Salmonella abortus equi.

Dada la semejanza en la composición química de E.c. y E.coli 055:B5, este último es un estándar primario potencial y E.c. puede considerarse como un excelente estándar secundario para pruebas de rutina con LAL.

Composición química de E.coli 055:B5, E.c. y S. abortus equi

Componente	<u>E.coli 055:B5</u> <u>Lote 665578</u> (%)	<u>E.c.</u> <u>E.coli 0113:H10:k0</u> (%)	<u>Salmonella</u> <u>abortus equi</u> (%)
Cetodeoxioctanato	1.40	3.88	6.8
Carbohidratos totales	35.05	34.4	82.2
Hexosa	19.66	23.6	26.0
Hexosamina	15.27	16.4	4.2
Esteres de ácidos grasos	5.02	-	5.1
Esteres de ácidos grasos y amida	9.7	3.5	10.7
Acidos nucleicos	4.28	2.58	-
Nitrógeno	3.18	2.58	-
Fósforo	-	1.35	5.0
Heptosa	-	2.38	-
Didesoxiazúcares	-	0.1	46.4

TABLA 1

Composición Química de S. abortus equi

Azúcar	%	Acidos grasos	%	Otros Constituyentes	%
D-Abecucosa	13.5	Láurico (C-12)	2.2		
L-Ramnososa	15.2	Mirfístico	1.8	Sodio	1.8
D-Manosa	15.7	D-3-hidroximirfístico	5.6	4-Amino-L-arabinosa	0.3
D-Heptosa	5.0			Etanolamina	0.2
D-Galactosa	17.8	Palmítico	1.1		
D-Glucosa	4.0				
Cetodesoxioctanato	6.8				
D-Glucosamina	82.2				

TABLA 2

IV. Estudios Bioquímicos de la Reacción LAL-LPS

Levin y Bang⁽⁴⁾ reportaron que el amebocito de *Limulus* con tiene una protefna coagulable y sugirieron que la reacción LAL-LPS involucra una reacción enzimática y que a las células libres del plasma de *Limulus* les falta alguna sustancia que provoca un incremento en la velocidad de coagulación. El lisado de amebocitos presenta un espectro de absorción máxima a 270-275 nm, el cual desaparece después de la formación del coágulo.

Young en 1972⁽⁴⁾, demostró que la reacción de lisado con LPS es enzimática. Este investigador fraccionó LAL por cromatografía en columna de Sephadex G-50 y G-75, donde se obtuvieron tres picos, dos de ellos después de la adición y recombinación con LPS dieron como resultado un gel. La fracción de alto peso molecular fue inactivada con calor y reactivada después del tratamiento con LPS, dando la formación de gel. La fracción termoestable de peso molecular intermedio dió la formación de un gel al combinarse con LPS. El pico tres no se afecta en la reacción. La fracción de peso molecular alto fue inhibida por diisopropil-florurofosfato, p-cloro-mercuribenzoato y p-cloro-mercurifenilsulfato, lo que indica una dependencia con hidroxilserina y grupos sulfhidrilos de actividad enzimática. La reacción de las fracciones I y II con LPS fueron dependientes de la temperatura y el pH óptimo a 37°C fue de 7.5⁽¹⁾.

Un problema inherente al fraccionamiento de LAL en la técnica convencional, es la química de la protefna que interviene en la coagulación espontánea.⁽⁴⁾

Young en 1972 sugirió que más de dos protefnas de LAL están involucradas en la reacción. Una enzima activada por LPS

que reaccionaría con una proteína coagulable, la cual polimerizaría en el interior del gel; la enzima no activa, no había sido purificada ni caracterizada. Solum en 1973 purificó y caracterizó parcialmente la proteína coagulable y el gel de proteína. La proteína coagulable o coagulógeno fue purificada por un proceso de acidificación seguido de una cromatografía Sephadex G-75 usando ácido acético 1.7 M como eluyente. La acidificación de LAL desnaturaliza la enzima y elimina la posibilidad de una coagulación espontánea durante la cromatografía, este tratamiento no afecta la actividad de la proteína coagulable.

El coágulo preparado con LAL-LPS fue purificado; usando gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS), obteniéndose un peso aproximado de 23,000 umas para la proteína coagulable y de 17,000 umas para el gel de la proteína. Esta pérdida de 6,000 unidades en el peso molecular, fue evidente al reaccionar con la enzima activada y probablemente representa la ruptura de una porción de la cadena del polipéptido por la enzima.

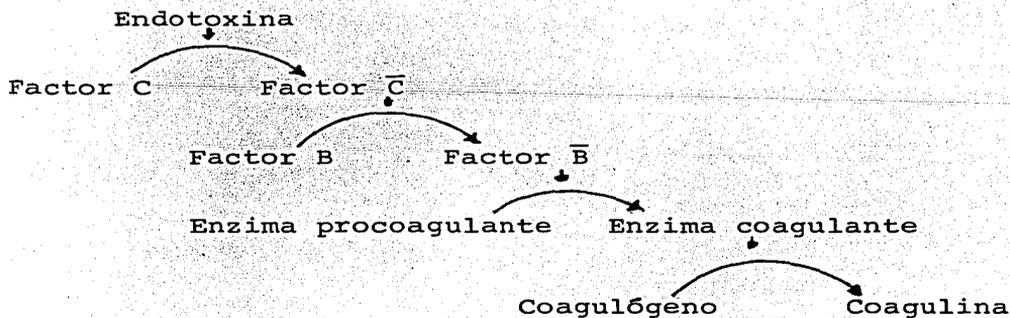
Las tres distintas subunidades de que constan los LPS, son:

- Región I, que consta de unidades repetidas de trisacáridos de secuencia única en cada bacteria en la superficie de la célula.
- Región II, que está compuesta de distintos carbohidratos, incluyendo al cetodesoxioctanato, presente sólo en bacterias Gram negativas.
- Región III, (Lípidos A), que se encuentra en todas las bacterias Gram negativas y es la responsable de la gelificación del LAL.

REGION I	REGION II	REGION III
	CORAZON DEL LPS	LIPIDO A

Mecanismo de coagulación del lisado

Una enzima pro-coagulante contenida en el lisado, es activada en presencia de la endotoxina y algunos cationes divalentes como Mg^{++} , Ca^{++} y Mn^{++} . Esta enzima una vez activada inicia una cascada de coagulación enzimática que actúa finalmente sobre el coagulógeno (una proteína coagulable de bajo peso molecular, presente en el lisado), para eliminar un pequeño péptido. El coagulógeno y la proteína coagulada se unen covalentemente por medio de un puente disulfuro, para dar un gel proteináceo o coagulina. (40).



donde:

- \bar{C} es la forma activa del factor C
- \bar{B} es la forma activa del factor B
- C es un polipéptido de dos cadenas, una pesada (80,000 umas) y otra ligera (43,000 umas) unidas por enlaces disulfuro

B es un polipéptido de 64,000 umas compuesto de dos cadenas idénticas unidas por un enlace disulfuro

V. Métodos de lectura de la prueba de LAL

- Inversión del tubo a 180°: Una vez que la mezcla endotoxina-LAL es incubada a 37°C por una hora, el tubo se invierte y se considera positiva la prueba si se ha formado un gel firme (1,34,36,8). Esta prueba se puede hacer semicuantitativa usando diferentes concentraciones de endotoxina estándar, donde la dilución más alta en la que se presenta la formación del gel es la que determina la concentración del problema:

$$\text{CONCENTRACION DEL PROBLEMA} = \frac{\text{CONCENTRACION DEL ESTANDAR}}{\text{POR FACTOR DE DILUCION}}$$

- Lectura turbidimétrica: Esta prueba se basa en el hecho de que un incremento en la concentración de endotoxina causa un incremento proporcional en la turbidez, debido a la precipitación de la proteína coagulable en el lisado. Se debe correr una curva estándar de endotoxina, y los resultados obtenidos deben ser lineales; donde todas las concentraciones usadas deben estar en un intervalo de 1 a 200 pg/ml.

La mezcla se lee a 360 nm con una celda de un centímetro y usando lámpara de tungsteno. Uno de los mayores problemas en este método, es que la variabilidad de lote a lote, se incrementa cuando el punto final se amplifica espectrofotométricamente (4,34,36,8).

- Método colorimétrico (Método de Lowry para cuantificación de proteínas): Este método ofrece todas las ventajas de una prueba cuantitativa de endotoxina en la que el incremento de concentración de endotoxina incrementa la cantidad de

proteína precipitada del lisado. La cantidad de proteína precipitada se determina usando la modificación de Oyama e Eagle del análisis de proteínas de Lowry. Es necesario correr un control positivo y un control negativo y una curva de proteína para eliminar la posibilidad de alguna interferencia (36,8,34).

- Método Nefelométrico: Actualmente se encuentra en investigación, el método nefelométrico para detección de pirógenos en parenterales de gran volumen por LAL. En éste, se cuantifica la concentración de proteína por la dispersión de la luz relativa y es más sensible y seguro que el método espectrofotométrico en el cual la concentración de endotoxina es leída por densidad óptica. El SDS se usa para terminar la reacción enzimática en el punto óptimo y asegurarse que las partículas precipitadas sean uniformes. La carboximetilcelulosa sódica (CMC), se adiciona como una suspensión estabilizadora. Este es un procedimiento rápido, ya que se puede realizar en una hora, y es muy sensible ya que sólo se requieren de 50 μ L de lisado. Pueden detectar hasta picogramos de endotoxina presentando un coeficiente de variación de 8.6% a una concentración de 50 pg de endotoxina/ml.
- Prueba en placa: Frauch (1974) fue el primero en sugerir una prueba simple en placa, usando una pipeta capilar. Se mezclan 10 μ L del lisado con igual volumen de muestra y esta preparación se deja reposar a 37°C por 30 minutos. Deben correrse simultáneamente un control positivo y un control negativo. Las muestras se preparan en placas con fondo negro y son fácilmente identificadas por la diferencia de viscosidad y turbidez (36,8).

Goto y Nakamura (1979) desarrollaron la prueba en placa con 20 μL del lisado. El lisado y las muestras se mezclan en una placa de vidrio siliconizado que se cubre y se deja reposar a 37°C por 30 minutos; cuando la mezcla se seca, forma una configuración característica (ver figura 1). (36)



Figura 1

Otro investigador japonés Okuguchi (1978) (33), improvisó un método en microplaca usando 10 μL del lisado en una cámara de cultivo por 30 minutos a 37°C. Después la prueba se tiñe con unas gotas de azul de bromofenol (BPB) y el punto final se determina usando un microscopio de contraste de fases. Las muestras formando un círculo lleno de residuo de células constituyen un resultado negativo para endotoxina, mientras que un resultado positivo se reconoce cuando la muestra presenta semejanza a una nube (ver figura 2). La endotoxina puede ser detectada solamente a una concentración de 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$. No es tan preciso y seguro como otros métodos, pero sí es de muy bajo costo.

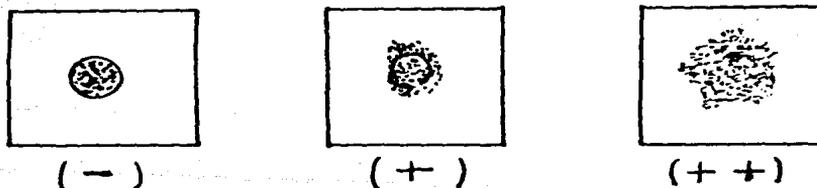


Figura 2

Flowers (1979) (33), reportó un método en placa modificado en el que se utilizan 10 μ L de LAL. Un tubo de vidrio despirogenizado de 9 mm, el cual ha sido sumergido en parafina, se coloca en una placa de vidrio proporcionando una superficie en la cual la reacción se lleva a cabo. El punto final se lee colocando verticalmente el tubo capilar en el centro del círculo y midiendo el flujo (hacia arriba) de la mezcla de reacción dentro del capilar. Ya que el flujo es inversamente proporcional a la concentración de endotoxina, un flujo mínimo se considera reacción positiva. Una prueba positiva tendrá una elevación en el nivel del líquido de solamente 4 mm; sin embargo, la muestra conteniendo poco o nada de endotoxina indicará hasta 10 a 12 mm. (ver figura 3).

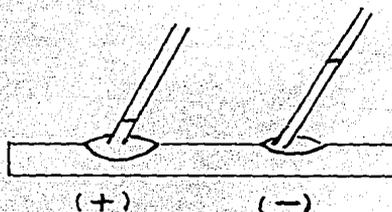
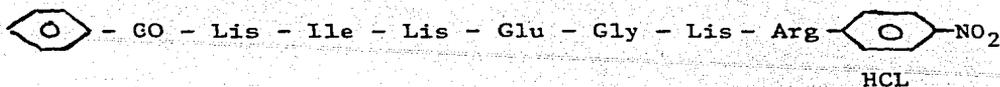


Figura 3

- Sustrato cromogénico: Algunos investigadores japoneses iniciaron estudios de detección de pirógenos por método de LAL, desarrollando un método de lectura denominado sustrato cromogénico. (36) La estructura del sustrato cromogénico es:



donde:

Lis = lisina

Ile = isoleucina

Glu = ac. glutámico

Gly = glicina

Arg = arginina

El método tiene la ventaja de la especificidad de la endotoxina activada, que es la enzima procoagulable, la cual presenta una actividad de amidasa específica para el grupo carboxiterminal y residuos de Gly-Arg. Cuando esta secuencia se conjuga con una sustancia cromogénica como la p-nitro anilida (pNA), esta se libera en proporción directa al incremento en la cantidad de endotoxina. Además, es posible medir la concentración de endotoxina midiendo la actividad amidasa como la liberación de un cromóforo. El sustrato cromogénico se mide por absorbancia a 405 nm. La prueba se realiza con 50 μ L del lisado. La relación cuantitativa entre el logaritmo de la concentración de endotoxina y la actividad amidasa puede observarse entre 1.5×10^{-6} y 5×10^{-2} μ g de endotoxina/ml. (36)

VI. Estudios realizados sobre otras posibles aplicaciones de la prueba de LAL

a) Estudios realizados para la detección de BGN en sangre.

Se han dirigido críticas severas a la prueba de LAL para la detección de BGN en sangre, la crítica se debe a la falta de correlación entre el número de bacterias obtenido en cultivos de sangre y las obtenidas con la prueba de LAL, en pacientes con bacteremia severa⁽⁴⁾, ya que en observaciones realizadas por Feldman y Pearson⁽⁴⁾, reportaron que solamente dos de veintiocho pacientes dieron prueba de LAL positiva, cuando se les comprobó por hemocultivo bacteremia Gram negativa.⁽⁴⁾ Por otra parte, en experimentos realizados en el laboratorio de la Univer

sidad de Medicina en conjunto con el Centro de Salud y el Departamento de Medicina Interna del Hospital Hartford, 1973⁽¹⁴⁾ con pacientes hospitalizados por sospecha de infecciones serias, se determinó endotoxina circulante presente por LAL en sólo 2 de 39 pacientes y sólo en uno de los casos se estableció antes que el diagnóstico por hemocultivo.

Aunque la prueba de LAL puede proveer resultados más rápidos que los hemocultivos, la necesidad de determinaciones seriadas para obtener resultados positivos reduce su valor diagnóstico. (14)

Un análisis de endotoxina puede ser más de valor pronóstico que de valor diagnóstico. Levin en 1970 reportó que hay una mayor proporción de mortalidad en pacientes con LAL positivo comparada con pacientes que tienen bacteremia Gram negativa con ausencia de endotoxinas. (14)

La prueba de LAL detecta la presencia de LPS en sangre, pero no provee la información de la fuente de éstos. Puede darse un resultado falso positivo por una infección la cual decrezca la permeabilidad de la barrera del intestino permitiendo la entrada de LPS al torrente sanguíneo y también es posible que la prueba de LAL produzca un falso negativo en pacientes con bacteremia Gram negativa por la presencia de un inhibidor en plasma y suero humano.

Existen algunos métodos para la eliminación de este inhibidor, pero no son completamente efectivos. El Dr. Arbeiter en comunicación personal⁽⁴⁾ indicó que los núcleos de inhibidor varían grandemente entre individuos; requiriéndose se a veces hasta tres extracciones con cloroformo.

Los resultados obtenidos con la prueba LAL dependerán de la sensibilidad del lisado usado y el número de bacterias presente en sangre. Algunos estudios sugieren que las BGN tienen aproximadamente 1×10^{-14} g de LPS por célula, mientras que el método de LAL usado reporta que detecta de 10^{-2} a 10^{-13} g de LPS/ml, o sea, de 100 a 1,000 bacterias/ml, por lo que si la sangre del paciente tiene pocas bacterias, se obtendrá un falso negativo. En realidad la prueba de LAL basándose en lo complementado por más investigadores, detecta números de 10,000 bacterias /ml, por lo tanto, hasta el momento, la prueba no se debe usar para diagnóstico de bacteremia. (4)

- b) Estudios realizados para la detección de bacteriuria Gram negativa.

El análisis de endotoxinas por *Límulus* fue evaluado como posible método para la detección rápida de bacteriuria Gram negativa. (1)

Se obtuvieron resultados cuantitativos, luego de permitir el reposo del Lisado de Amebocitos de *Límulus* con 10 diluciones de orinas sin tratar. Una curva estándar de la actividad de LAL y conteo de células viables de *E.coli* y *K.pneumoniae* en orina demostraron que una reacción positiva a LAL en dilución de 1:100 ó 1:1000 indican una cuenta de colonias de al menos 100,000 bacterias /ml.

ORGANISMO	CUENTA DE COLONIAS ANTES DE LA ADICION DE GENTAMICINA	DESPUES DE ADICION DE GENTAMICINA	REACCION LAL ANTES Y DESPUES DE LA ADICION DE GENTAMICINA			
			SIN DILUIR	1:10	1:100	1:1000
<i>E.coli</i>	1.42×10^4	4	+	+	+	+
<i>K.pneumoniae</i>	1.20×10^4	0	+	+	+	+

TABLA 3

La orina tratada con gentamicina no altera los resultados de LAL por lo que la no viabilidad de la bacteria no afecta la detección y cuantificación del número de células presente (ver tabla 3).

La cuantificación experimental se confirmó comparando la prueba de LAL con cuenta en placa en 209 muestras de orina. La prueba de LAL detectó 92% de todas las muestras conteniendo más de 100,000 microorganismos/ml y 100% de orina, conteniendo más de diez bacterias Gram negativas/ml. Veinticinco muestras presentaron más de 100,000 microorganismos/ml de orina, en éstas se incluyen doce aislamientos de E. coli, cinco de K. pneumoniae, dos especies de Proteus sp, una de Pseudomona sp, una de Staphylococcus aureus y una de Candida albicans. La prueba de LAL no parece detectar levaduras ni bacterias Gram positivas a concentraciones mayores de 103 células/ml.

Dentro de las ventajas que se encuentran con el uso de la prueba de LAL para diagnosticar la bacteriuria Gram negativa, es que puede utilizarse en el diagnóstico de pacientes con bacteriurias asintomáticas, no se alteran los resultados por el uso de antibióticos y puede detectarse la presencia de bacterias anaerobias Gram Negativas. Las desventajas de esta prueba, es que no detecta bacterias Gram positivas, ni levaduras y sólo un bajo porcentaje de infecciones del tracto urinario, son causadas por bacterias Gram negativas. Además, no provee información relativa a la identificación del microorganismo o de la presencia de una mezcla de bacterias ni tampoco información sobre la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos.

c) Otras aplicaciones.

Jorgensen y Smith demostraron el valor de la prueba LAL, detectando LPS en albúmina humana inyectable. Estos trabajos describieron dos casos de septicemia, resultado del uso de una solución intravenosa contaminada con Pseudomona aeruginosa. El uso de LAL permitió la rápida detección de LPS en esta solución; la identificación del microorganismo se estableció por métodos de cultivo. (4)

En adición a la aplicación médica, la prueba de LAL ha probado ser útil en investigación dental para la determinación de niveles de endotoxina asociada con placas dentales y tejido gingival. (4) Se estableció que en pacientes con enfermedad periodontal, existe una relación entre la cantidad de LPS detectado en muestras de exudado de la placa dental, saliva, tejido gingival y la severa inflamación; los LPS son probablemente los responsables de la enfermedad, aunque no los únicos. La higiene oral o tratamiento destinado a reducir la cantidad de BGN en la cavidad oral, limita o controla el aspecto inflamatorio de la enfermedad. La prueba de LAL aparece como una perspectiva de estudio en los efectos causados por LPS en la enfermedad periodontal. (6)

En años recientes, (4) se ha destinado mucho tiempo y esfuerzo a preservar el medio ambiente y a favorecer el mantenimiento de un balance del ecosistema. Se sabe que las bacterias son las responsables de la mineralización de más del 50% de los organismos, tanto terrestres como acuáticos.

El método de LAL en conjunción con la técnica de determinación de biomasa total, ha sido usado como índice de la contaminación en el medio acuático. (4)

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

DETERMINACION DE PIROGENOS CON LAL

A. Obtención de la muestra de prueba:

Nota: Para prevenir contaminación por endotoxina bacteriana, deben utilizarse técnicas asépticas.

- a) Soluciones Tipo A. Se drena la cantidad requerida en una probeta graduada, libre de pirógenos.
- b) Soluciones Tipo B y Tipo C. La muestra debe tomarse a través del tubo de salida, sin retirar el disco de hule latex. Se introduce la jeringa libre de pirógenos y se invierte.

B. Procedimiento de la prueba. Se deben preparar:

- a) Tres controles negativos.
- b) Los siguientes controles positivos:

Un tubo para 200 pg/ml de estándar de endotoxina

Tres tubos de 50 pg/ml de estándar de endotoxina

Un tubo de 12 pg/ml de estándar de endotoxina

C) Tubos de muestra:

Agregar 0.1 ml a cada tubo de la solución estándar y de muestra respectivamente.

Trátase de la siguiente manera:

1. Si se necesita más de un vial, se debe hacer una mezcla.
2. Agregar 0.1 ml del lisado a cada tubo, primero a los tubos de control
3. Tapar con papel parafilm y mezclar suavemente sin que se forme espuma.
4. Dejar reposar los tubos en baño maría a 37°C por una hora.
5. Centrifugar por un mínimo de diez minutos.
6. Remover el sobrenadante y aspirarlo por vacío, sin romper el coágulo.
7. Disolver el coágulo adicionando 0.2 ml de solución acuosa de NaOH 0.75 N (las muestras pueden ser guardadas hasta tres horas en este paso).
8. Para la cuantificación, preparar dos blancos de proteína y la curva estándar de proteína (ver Apéndice en el Capítulo VIII de este trabajo).
9. Los blancos son tratados igual que las muestras, pero deben contener 0.2 ml de solución acuosa NaOH 0.75 N en lugar del estándar de proteína.
10. Dejar reposar durante diez minutos a temperatura ambiente.
11. Adicionar 0.1 ml de reactivo de Fenol Folin 1N. Mezclar por diez segundos, esperar aproximadamente diez segundos entre la adición del reactivo a cada tubo para evitar que transcurran más de 30 minutos de reposo al leer su absorbancia. Este punto es crítico, ya que el color decae después de treinta minutos.
12. Dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

13. Medir la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro adecuado.
14. Ajustar el espectrofotómetro a cero con el blanco de proteína y leer las muestras siguiendo el orden en que fue adicionado el Fenol-Folín.

C. Registro de Resultados:

La prueba de LAL debe tener una hoja control Forma N° 1 (que muestra los datos que son criterio para la aprobación), y una hoja de control Forma N° 2 (que muestra los resultados en absorbancia de las muestras probadas) (ver anexos).

D. Interpretación de resultados:

- a) Todas las muestras deben tener valores menores que el obtenido para 50 pg/ml.
- b) El promedio de los valores del control negativo debe ser menor que 0.2 de absorbancia. (37)
- c) Debe haber un mínimo de 0.2 unidades entre la diferencia de absorbancia del control negativo y el de 50 pg/ml. (37)
- d) Debe haber un mínimo de 0.2 unidades entre la diferencia de absorbancia de 50 pg/ml y el de 200 pg/ml. (37)
- e) Las muestras que tengan absorbancia igual o arriba del más bajo de los resultados obtenidos para 50 pg/ml, deben ser probadas nuevamente por triplicado.
- f) Si en la repetición de la prueba el promedio es mayor o igual que el valor más bajo obtenido para la concentración de 50 pg/ml, la misma muestra deberá ser probada en ocho conejos. En casos en los que la muestra sea muy pequeña

e insuficiente, se deben tomar al azar, unidades adicionales del lote.

- g) Si el promedio de los valores de la repetición de la prueba es menor que la absorbancia obtenida del valor más bajo dado por el estándar de endotoxina de 50 pg/ml, el producto puede considerarse no pirogénico.
- h) La curva de albúmina usada como estándar de proteína en la prueba de LAL, establece una diferenciación colorimétrica progresiva entre las concentraciones, las cuales deben ser relativamente consistentes entre día y día. Un cambio drástico representa un problema en el equipo o en los reactivos; debe detectarse la falla y efectuarse las correcciones necesarias.

III. A. CALIFICACION DE LA PRUEBA DE LAL

- a) Es necesario eliminar la posibilidad de un falso negativo, causado por la inhibición de la reacción de gelación o de la reacción de Lowry.
- b) También es necesario hacer en todos los laboratorios, la calificación de cada nuevo producto que se va a introducir a la prueba de LAL.
- c) Para las soluciones que contengan la misma composición química, pero diferentes medidas o recipientes, una sola calificación es suficiente.
- d) Si la solución requiere ser diluida para la prueba en conejos, ésta debe ser diluida de la misma manera para la prueba de LAL.
- e) Los equipos que consten de componentes similares, deben ser agrupados siempre en categorías para su calificación.

f) Si el proceso de esterilización de equipo médico y material de curación cambia de óxido de etileno a radiaciones gama, éstos deben ser recalificados.

A. Procedimiento.

a) Preparación de la endotoxina estándar.

Prepare la curva estándar de endotoxina al inicio de la prueba con un lote de agua libre de pirógenos, previamente calificada; en caso de equipos que han sido enjuagados con solución salina, preparar la curva con solución salina, previamente calificada.

b) Asimismo, preparar:

Un tubo que contenga 200 pg/ml de endotoxina estándar

Tres tubos que contengan 50 pg/ml de endotoxina estándar

Un tubo que contenga 12 pg/ml de endotoxina estándar

Tres tubos para control negativo.

c) Registrar los datos obtenidos de la Forma N° 3 (anexa).

B. Criterio de evaluación de la prueba de calificación.

a) El promedio de absorbancias del control negativo, debe ser menor de 0.2. (37)

b) Debe haber más de 0.2 unidades de absorbancia de diferencia entre el promedio del control negativo y el promedio del estándar de 50 pg/ml. (37)

c) Debe haber más de 0.2 unidades de absorbancia entre el promedio del estándar de 50 pg/ml y el de 200 pg/ml. (37)

d) La curva estándar del agua o de la solución salina usada como control debe cumplir los criterios anteriores.

- e) Para equipos médicos (equipos auxiliares para la salud y materiales de curación). Compare la absorbancia promedio del estándar de 50 pg/ml de endotoxina para el control de agua o de solución salina y del agua o la solución obtenida del drenado del equipo médico, si es mayor de 0.1 unidades, la prueba debe ser repetida.
- f) Para recipientes y equipos susceptibles de ser sumergidos. Debido a que en el enjuague es extraída la endotoxina de toda la superficie, el control negativo puede ser 0.2 unidades más alto.

III. B. MUESTRAS QUE DEBEN TRATARSE PARA EVITAR INHIBICION EN LA PRUEBA DE LAL

Hay algunos productos biológicos y parenterales que contienen sustancias que inhiben la formación de gel y dan resultado falso negativo. En algunos productos, ésta inhibición puede evitarse tratando el producto antes de la prueba.

Por ejemplo, las soluciones ácidas y básicas pueden inhibir la formación del gel en la prueba de LAL, por lo que debe ajustarse el pH en el intervalo de 6.5-7.2.

Otro ejemplo, lo constituye la presencia de alguna sustancia anticoagulante, lo cual hace necesario el tratar previamente la muestra con un absorbente adecuado, como puede ser el CaCO_3 .

HOJA CONTROL DE LA PRUEBA DE PIROGENOS CON LIMULUS

SOLUCION DE PRUEBA		CURVA ESTANDAR DE ENDOTOXINA (ABSORBANCIA)			
DESCRIPCION	CLAVE LOTE	200 pg/ml	50 pg/ml	12 pg/ml	Control Negativo
	1	1 _____ 2 _____ 3 _____ Valor mínimo	1 _____ 2 _____ 3 _____ Valor mínimo	1 _____	1 _____ 2 _____ 3 _____ Promedio
	1	1 _____ 2 _____ 3 _____ Valor mínimo	1 _____ 2 _____ 3 _____ Valor mínimo		1 _____ 2 _____ 3 _____ Promedio

CURVA ESTANDAR DE ALBUMINA HUMANA

CONCENTRACION	ABSORBANCIA
100 µg/ml	
200 µg/ml	
400 µg/ml	
800 µg/ml	

LOTE DE REACTIVO LAL _____
 LOTE DE ALBUMINA HUMANA _____
 REALIZADO POR _____
 SUPERVISADO POR _____

CALIFICACION DE LA PRUEBA DE LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS

CLAVE DEL PRODUCTO _____ LOTE DE H₂O CONTROL _____
 LOTE DEL PRODUCTO _____ LOTE DE LISADO _____
 LOTE DE ENDOTOXINA _____

CURVA ESTANDAR DE H₂O

	ABSORBANCIA	PROMEDIO		
CONTROL NEGATIVO	_____	_____	DIFERENCIA	0.2
12 pg/ml DE ENDOTOXINA	_____	_____	50 pg/ml-negativo	0.2
50 pg/ml DE ENDOTOXINA	_____	_____	DIFERENCIA	0.2
200 pg/ml DE ENDOTOXINA	_____	_____	200 pg/ml-50 pg/ml	0.2

CURVA DE CALIFICACION

	ABSORBANCIA	PROMEDIO		
CONTROL NEGATIVO	_____	_____	DIFERENCIA	0.2
12 pg/ml DE ENDOTOXINA	_____	_____	50 pg/ml-negativo	0.2
50 pg/ml DE ENDOTOXINA	_____	_____	DIFERENCIA	0.2
200 pg/ml DE ENDOTOXINA	_____	_____	200 pg/ml-50 pg/ml	0.2

SUERO DE ALBUMINA

HUMANA µg/0.2 ml	ABSORBANCIA			
20	_____		PROMEDIO DE CONTROL NEGATIVO	0.2
40	_____		DIFERENCIAS	0.2
80	_____	EQUIPOS SOLAMENTE	PROMEDIO DE ABSORBANCIAS	
160	_____		50 pg/ml Control H ₂ O	
			PROMEDIO DE ABSORBANCIAS	
			50 pg/ml de Producto	

PROBADO POR: _____ FECHA _____
 REVISADO POR: _____ FECHA _____
 SUPERVISADO POR: _____ FECHA _____ DIFERENCIA _____ 0.1

Si no cumple lo anterior, falla la prueba.

III. C. RESULTADOS

Comparación de resultados de las pruebas para detección de pirogenos (Conejos/Limulus), realizados en Travenol México, durante el año 1982.

1. Solución Tipo A. Resultados

CLAVE	LOTE	ESTANDAR DE ENDOTOXINA EN PICOGRAMOS (ABSORBANCIAS)				LAL	CONEJOS
		NEG.	12	50	200		
A	1	0.040	0.179	0.417	0.918	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	2	0.068	0.179	0.317	0.718	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	3	0.061	0.191	0.314	0.738	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	4	0.061	0.191	0.314	0.738	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	5	0.049	0.193	0.417	0.968	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	6	0.131	0.216	0.439	0.853	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	7	0.131	0.216	0.439	0.853	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	8	0.131	0.216	0.439	0.853	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	9	0.131	0.216	0.439	0.853	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	10	0.146	0.173	0.328	0.703	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	11	0.127	0.229	0.479	0.974	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	13	0.152	0.226	0.399	0.960	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	14	0.127	0.229	0.479	0.971	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	15	0.127	0.229	0.479	0.971	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	16	0.127	0.229	0.479	0.971	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	17	0.127	0.229	0.479	0.971	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	18	0.104	0.193	0.314	0.714	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	19	0.140	0.229	0.375	0.870	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	20	0.112	0.189	0.326	0.630	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	21	0.063	0.185	0.339	0.698	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	22	0.063	0.185	0.339	0.698	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

A	23	0.084	0.198	0.313	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	24	0.064	0.193	0.318	0.620	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	25	0.064	0.193	0.318	0.620	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	26	0.060	0.193	0.299	0.521	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	27	0.067	0.174	0.349	0.619	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	28	0.092	0.193	0.300	0.692	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	29	0.058	0.193	0.387	0.799	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	30	0.102	0.206	0.415	0.832	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	31	0.102	0.198	0.359	0.863	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	32	0.135	0.282	0.489	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	33	0.134	0.282	0.489	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	34	0.083	0.206	0.359	0.716	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	35	0.093	0.195	0.335	0.682	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	36	0.093	0.201	0.493	0.814	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	37	0.093	0.201	0.493	0.814	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	38	0.100	0.189	0.355	0.701	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	39	0.100	0.189	0.355	0.701	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	40	0.099	0.198	0.314	0.728	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	41	0.049	0.185	0.337	0.715	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	42	0.081	0.189	0.362	0.784	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	43	0.081	0.189	0.362	0.784	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	44	0.070	0.189	0.318	0.718	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	45	0.099	0.198	0.369	0.741	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	46	0.089	0.189	0.338	0.742	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	47	0.082	0.206	0.324	0.851	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	48	0.066	0.183	0.306	0.702	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	49	0.096	0.196	0.382	0.752	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

A	50	0.096	0.196	0.382	0.752	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	51	0.077	0.189	0.402	0.698	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	52	0.087	0.195	0.325	0.745	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	53	0.091	0.145	0.374	0.831	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	54	0.109	0.204	0.393	0.792	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	55	0.085	0.199	0.410	0.728	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	56	0.087	0.188	0.334	0.702	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	57	0.093	0.194	0.330	0.719	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	58	0.093	0.194	0.330	0.719	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	59	0.021	0.216	0.420	0.901	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	60	0.080	0.198	0.319	0.810	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	61	0.073	0.190	0.309	0.738	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	62	0.078	0.194	0.311	0.692	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	63	0.110	0.236	0.482	0.914	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	64	0.094	0.182	0.312	0.766	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	65	0.079	0.189	0.361	0.681	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	66	0.094	0.199	0.399	0.734	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	67	0.094	0.199	0.399	0.734	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	68	0.100	0.193	0.343	0.730	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	69	0.079	0.181	0.306	0.699	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	70	0.112	0.216	0.971	1.158	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	71	0.130	0.265	0.489	1.086	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	72	0.091	0.222	0.491	0.997	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	73	0.073	0.185	0.339	0.921	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	74	0.112	0.210	0.471	1.158	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	75	0.066	0.195	0.314	0.912	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
A	76	0.060	0.188	0.314	0.901	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

2. Solución Tipo B. Resultados

CLAVE	LOTE	ESTANDAR DE ENDOTOXINA EN PICOGRAMOS (ABSORBANCIAS)				LAL	CONEJOS
		NEG.	12	50	200		
B	1	0.119	0.229	0.505	1.074	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	2	0.119	0.229	0.505	1.074	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	3	0.112	0.206	0.526	1.120	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	4	0.112	0.206	0.526	1.120	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	5	0.160	0.196	0.412	0.914	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	6	0.126	0.196	0.412	0.914	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	7	0.126	0.196	0.412	0.914	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	8	0.076	0.189	0.379	0.743	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	9	0.076	0.189	0.379	0.743	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	10	0.076	0.189	0.379	0.743	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	11	0.042	0.131	0.294	0.614	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	12	0.042	0.131	0.294	0.614	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	13	0.042	0.131	0.294	0.614	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	14	0.042	0.131	0.294	0.614	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	15	0.042	0.131	0.294	0.614	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	16	0.042	0.131	0.294	0.614	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	17	0.136	0.230	0.514	1.128	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	18	0.136	0.230	0.514	1.128	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	19	0.136	0.230	0.514	1.128	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	20	0.136	0.230	0.514	1.128	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	21	0.112	0.206	0.526	1.120	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	22	0.137	0.219	0.513	1.141	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	23	0.137	0.219	0.513	1.141	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	24	0.137	0.219	0.513	1.141	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	25	0.137	0.219	0.513	1.141	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	26	0.137	0.219	0.513	1.141	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	27	0.137	0.219	0.513	1.141	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	28	0.137	0.219	0.513	1.141	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	29	0.093	0.189	0.311	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	30	0.093	0.189	0.311	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	31	0.093	0.189	0.311	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	32	0.093	0.189	0.311	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	33	0.093	0.189	0.311	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	34	0.093	0.189	0.311	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	35	0.093	0.189	0.311	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	36	0.124	0.196	0.331	0.635	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	37	0.124	0.196	0.331	0.635	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	38	0.124	0.196	0.331	0.635	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	39	0.124	0.196	0.331	0.635	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	40	0.093	0.189	0.311	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	41	0.093	0.189	0.311	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	42	0.093	0.189	0.311	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	43	0.137	0.219	0.513	1.141	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	44	0.069	0.194	0.350	0.717	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	45	0.069	0.194	0.350	0.717	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	46	0.069	0.194	0.350	0.717	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	47	0.069	0.194	0.350	0.717	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	48	0.132	0.238	0.489	0.191	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	49	0.132	0.238	0.489	1.191	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	50	0.132	0.238	0.489	1.191	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	51	0.132	0.238	0.489	1.191	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	52	0.132	0.238	0.489	1.191	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	53	0.132	0.238	0.489	1.191	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	54	0.068	0.196	0.340	0.961	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	55	0.068	0.196	0.340	0.961	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	56	0.068	0.196	0.340	0.961	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	57	0.113	0.248	0.395	1.352	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	58	0.113	0.248	0.395	1.352	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	59	0.113	0.248	0.395	1.352	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	60	0.113	0.248	0.395	1.352	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	61	0.113	0.248	0.395	1.352	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	62	0.146	0.231	0.539	1.129	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	63	0.161	0.455	0.739	1.525	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	64	0.161	0.455	0.739	1.525	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	65	0.161	0.455	0.739	1.525	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	66	0.161	0.455	0.739	1.525	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	67	0.161	0.455	0.739	1.525	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	68	0.125	0.239	0.613	1.180	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	69	0.125	0.239	0.613	1.180	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	70	0.125	0.239	0.613	1.180	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	71	0.140	0.199	0.388	0.752	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	72	0.140	0.199	0.388	0.752	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	73	0.140	0.199	0.388	0.752	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	74	0.140	0.199	0.388	0.752	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	75	0.087	0.192	0.331	0.639	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	76	0.087	0.192	0.331	0.639	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	77	0.082	0.196	0.422	0.790	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	78	0.082	0.196	0.422	0.790	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	79	0.082	0.196	0.422	0.790	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	80	0.082	0.196	0.422	0.790	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	81	0.082	0.196	0.422	0.790	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	82	0.082	0.196	0.422	0.790	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	83	0.082	0.196	0.422	0.790	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	84	0.082	0.196	0.422	0.790	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	85	0.136	0.199	0.293	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	86	0.136	0.199	0.293	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	87	0.136	0.199	0.293	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	88	0.146	0.231	0.539	1.129	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	89	0.146	0.231	0.539	1.129	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	90	0.077	0.198	0.340	0.814	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	91	0.077	0.198	0.340	0.814	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	92	0.077	0.198	0.340	0.414	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	93	0.102	0.198	0.302	0.785	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	94	0.102	0.198	0.302	0.785	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	95	0.140	0.199	0.388	0.752	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	96	0.073	0.213	0.421	0.813	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	97	0.073	0.213	0.421	0.813	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	98	0.073	0.213	0.421	0.813	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	99	0.055	0.195	0.333	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	100	0.079	0.190	0.312	0.662	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	101	0.079	0.190	0.312	0.662	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	102	0.119	0.202	0.410	0.714	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	103	0.119	0.202	0.410	0.714	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	104	0.119	0.202	0.410	0.714	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	105	0.055	0.195	0.333	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	106	0.055	0.195	0.333	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	107	0.055	0.195	0.333	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	108	0.055	0.195	0.333	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	109	0.055	0.195	0.333	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	110	0.055	0.195	0.333	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	111	0.140	0.199	0.388	0.752	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	112	0.079	0.193	0.313	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	113	0.064	0.182	0.342	0.691	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	114	0.064	0.182	0.342	0.691	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	115	0.064	0.182	0.342	0.691	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	116	0.134	0.253	0.591	1.110	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	117	0.134	0.253	0.591	1.110	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	118	0.134	0.253	0.591	1.110	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	119	0.122	0.242	0.499	1.120	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	120	0.118	0.272	0.418	0.835	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	121	0.079	0.193	0.313	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	122	0.079	0.193	0.313	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	123	0.079	0.193	0.313	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	124	0.140	0.338	0.619	1.246	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	125	0.140	0.338	0.619	1.246	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	126	0.140	0.338	0.619	1.246	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	127	0.140	0.238	0.619	1.246	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	128	0.153	0.302	0.499	0.952	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	129	0.093	0.192	0.506	0.719	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	130	0.093	0.192	0.506	0.719	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	131	0.093	0.192	0.506	0.719	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	132	0.093	0.192	0.506	0.719	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	133	0.093	0.192	0.506	0.719	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	134	0.179	0.461	0.695	1.252	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	135	0.179	0.461	0.695	1.252	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	136	0.179	0.461	0.695	1.252	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	137	0.059	0.186	0.319	0.691	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	138	0.059	0.186	0.319	0.691	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	139	0.059	0.186	0.319	0.691	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	140	0.059	0.126	0.319	0.691	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	141	0.077	0.184	0.312	0.629	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	142	0.077	0.184	0.312	0.629	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	143	0.077	0.184	0.312	0.629	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	144	0.142	0.229	0.520	0.888	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	145	0.142	0.229	0.520	0.888	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	146	0.142	0.229	0.520	0.888	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	147	0.142	0.299	0.520	0.888	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	148	0.145	0.209	0.416	0.801	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	149	0.145	0.209	0.416	0.801	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	150	0.145	0.209	0.416	0.801	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	151	0.077	0.189	0.317	0.629	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	152	0.077	0.189	0.317	0.629	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	153	0.077	0.189	0.317	0.629	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	154	0.077	0.189	0.317	0.629	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	155	0.061	0.196	0.398	0.892	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	156	0.057	0.191	0.369	0.612	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	157	0.057	0.191	0.369	0.612	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	158	0.057	0.191	0.369	0.612	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	159	0.057	0.191	0.369	0.612	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	160	0.057	0.191	0.369	0.612	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	161	0.057	0.191	0.369	0.614	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	162	0.057	0.196	0.298	0.814	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	163	0.057	0.196	0.298	0.814	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	164	0.057	0.196	0.298	0.814	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	165	0.061	0.196	0.398	0.892	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	166	0.026	0.191	0.331	0.688	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	167	0.026	0.191	0.331	0.688	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	168	0.026	0.191	0.331	0.688	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	169	0.026	0.191	0.331	0.688	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	170	0.150	0.283	0.546	1.254	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	171	0.150	0.283	0.546	1.254	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	172	0.158	0.374	0.498	1.080	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	173	0.158	0.374	0.498	1.080	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	174	0.158	0.374	0.498	1.080	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	175	0.158	0.374	0.498	1.080	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	176	0.131	0.318	0.391	1.182	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	177	0.131	0.318	0.391	1.182	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	178	0.050	0.257	0.362	0.699	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	179	0.050	0.257	0.362	0.699	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	180	0.050	0.257	0.362	0.699	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	181	0.050	0.257	0.362	0.699	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	182	0.050	0.257	0.362	0.699	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	183	0.050	0.257	0.362	0.699	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	184	0.102	0.190	0.318	0.728	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	185	0.102	0.190	0.318	0.728	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	186	0.102	0.190	0.318	0.728	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	187	0.102	0.190	0.318	0.728	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	188	0.108	0.258	0.519	1.012	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	189	0.108	0.252	0.519	1.012	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	190	0.108	0.258	0.519	1.012	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	191	0.084	0.195	0.319	0.718	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	192	0.137	0.221	0.428	0.810	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	193	0.137	0.221	0.428	0.810	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	194	0.181	0.459	0.785	1.586	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	195	0.090	0.241	0.526	0.779	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	196	0.181	0.459	0.785	1.586	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	197	0.090	0.241	0.326	0.789	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	198	0.156	0.284	0.519	0.928	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	199	0.156	0.284	0.519	0.928	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	200	0.156	0.284	0.519	0.928	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	201	0.156	0.284	0.519	0.928	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	202	0.070	0.184	0.305	0.688	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	203	0.070	0.184	0.305	0.688	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	204	0.070	0.184	0.305	0.688	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	205	0.136	0.231	0.455	0.841	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	206	0.136	0.231	0.455	0.841	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	207	0.136	0.231	0.455	0.841	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	208	0.136	0.231	0.455	0.841	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	209	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	210	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	211	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	212	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	213	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	214	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	215	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	216	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	217	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	218	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	219	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	220	0.110	0.198	0.428	0.895	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	221	0.080	0.182	0.305	0.698	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	222	0.080	0.182	0.305	0.698	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	223	0.080	0.182	0.305	0.698	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	224	0.080	0.182	0.305	0.698	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	225	0.092	0.198	0.428	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	226	0.092	0.198	0.428	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	227	0.092	0.198	0.428	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	228	0.092	0.198	0.428	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	229	0.092	0.198	0.428	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	221	0.092	0.198	0.428	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	222	0.092	0.198	0.428	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	223	0.092	0.198	0.428	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	224	0.092	0.185	0.318	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	225	0.092	0.185	0.318	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	226	0.092	0.185	0.318	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	227	0.092	0.185	0.318	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	228	0.092	0.185	0.318	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	229	0.092	0.185	0.318	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	230	0.092	0.185	0.318	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	231	0.092	0.185	0.318	0.758	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	232	0.095	0.198	0.422	0.703	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	233	0.095	0.198	0.422	0.703	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	234	0.095	0.198	0.422	0.703	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	235	0.121	0.202	0.429	0.875	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	236	0.121	0.202	0.429	0.875	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	237	0.121	0.202	0.429	0.875	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	238	0.121	0.202	0.429	0.875	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	239	0.121	0.202	0.429	0.875	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	240	0.121	0.202	0.429	0.875	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	241	0.115	0.266	0.492	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	242	0.115	0.266	0.492	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	243	0.115	0.266	0.492	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	244	0.084	0.196	0.315	0.735	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	245	0.084	0.196	0.315	0.735	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	246	0.084	0.196	0.315	0.735	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	247	0.124	0.279	0.534	0.935	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	248	0.124	0.279	0.534	0.935	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	249	0.078	0.198	0.354	0.765	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	250	0.079	0.185	0.319	0.752	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	251	0.173	0.256	0.369	0.857	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	252	0.173	0.256	0.369	0.857	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	253	0.173	0.256	0.369	0.857	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	254	0.160	0.255	0.541	0.928	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	255	0.160	0.255	0.541	0.928	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	256	0.128	0.271	0.581	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	257	0.128	0.271	0.581	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	258	0.128	0.271	0.581	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	259	0.128	0.271	0.581	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	260	0.128	0.271	0.581	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	261	0.128	0.271	0.581	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	262	0.128	0.271	0.581	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	263	0.149	0.235	0.491	0.874	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	264	0.149	0.235	0.491	0.874	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	265	0.149	0.235	0.491	0.874	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	266	0.121	0.263	0.502	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	267	0.141	0.234	0.335	1.067	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	268	0.121	0.263	0.502	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	269	0.121	0.263	0.502	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	270	0.121	0.263	0.502	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	271	0.061	0.189	0.327	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	272	0.061	0.189	0.327	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	273	0.061	0.189	0.327	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	274	0.146	0.286	0.534	1.180	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	275	0.146	0.286	0.534	1.180	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	276	0.146	0.285	0.534	1.180	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	277	0.146	0.286	0.534	1.180	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	278	0.138	0.209	0.488	0.925	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	279	0.138	0.209	0.488	0.925	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	280	0.138	0.209	0.488	0.925	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	281	0.173	0.272	0.512	1.002	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	282	0.173	0.272	0.512	1.002	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	283	0.173	0.272	0.512	1.002	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	284	0.139	0.218	0.485	0.982	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	285	0.139	0.218	0.485	0.982	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	286	0.139	0.218	0.485	0.982	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	287	0.160	0.235	0.541	0.928	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	288	0.160	0.235	0.541	0.928	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	289	0.154	0.216	0.488	0.992	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	290	0.061	0.189	0.306	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	291	0.028	0.193	0.339	0.932	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	292	0.028	0.193	0.339	0.932	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	293	0.028	0.193	0.339	0.932	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	294	0.028	0.193	0.339	0.932	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	295	0.061	0.189	0.327	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	296	0.061	0.189	0.327	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	297	0.093	0.210	0.427	0.888	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	298	0.093	0.210	0.427	0.888	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	299	0.174	0.301	0.661	1.394	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	300	0.174	0.301	0.661	1.394	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	301	0.174	0.301	0.661	1.394	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	302	0.174	0.301	0.661	1.394	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	303	0.148	0.235	0.520	1.139	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	304	0.148	0.235	0.520	1.139	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	305	0.148	0.235	0.520	1.139	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	306	0.148	0.234	0.520	1.139	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	307	0.148	0.235	0.520	1.139	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	308	0.083	0.198	0.353	0.862	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	309	0.083	0.198	0.353	0.862	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	310	0.083	0.198	0.353	0.862	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	311	0.078	0.193	0.339	0.932	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	312	0.078	0.193	0.339	0.932	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	313	0.078	0.193	0.339	0.932	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	314	0.089	0.198	0.328	0.805	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	315	0.089	0.198	0.328	0.805	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	316	0.089	0.198	0.328	0.805	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	317	0.062	0.189	0.321	0.815	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	318	0.089	0.189	0.416	0.733	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	319	0.089	0.189	0.416	0.733	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	320	0.093	0.189	0.333	0.763	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	321	0.093	0.189	0.333	0.763	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	322	0.085	0.192	0.319	0.685	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	323	0.074	0.188	0.329	0.676	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	324	0.074	0.188	0.329	0.676	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	325	0.074	0.188	0.329	0.676	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	326	0.081	0.185	0.426	0.839	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	327	0.081	0.185	0.426	0.839	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	328	0.081	0.185	0.426	0.839	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	329	0.081	0.185	0.426	0.839	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	330	0.081	0.185	0.426	0.839	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	331	0.162	0.214	0.452	0.920	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	332	0.162	0.214	0.452	0.920	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	333	0.063	0.185	0.333	0.726	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	334	0.063	0.185	0.333	0.726	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	335	0.112	0.212	0.412	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	336	0.112	0.212	0.412	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	337	0.112	0.212	0.412	1.009	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	338	0.056	0.199	0.398	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	339	0.056	0.199	0.398	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	340	0.056	0.199	0.398	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	341	0.056	0.199	0.398	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	342	0.056	0.199	0.398	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	343	0.056	0.199	0.398	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	344	0.056	0.199	0.398	0.795	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	345	0.091	0.189	0.312	0.653	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	346	0.091	0.091	0.312	0.653	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	347	0.091	0.189	0.312	0.653	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	348	0.091	0.189	0.312	0.653	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	348	0.048	0.199	0.328	0.814	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	349	0.067	0.212	0.450	0.963	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	350	0.067	0.212	0.450	0.963	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	351	0.067	0.212	0.450	0.962	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	352	0.048	0.199	0.328	0.814	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	353	0.048	0.199	0.328	0.814	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	354	0.131	0.281	0.512	1.141	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	355	0.131	0.281	0.512	1.141	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	356	0.131	0.281	0.512	1.141	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	357	0.079	0.202	0.420	0.959	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	358	0.079	0.202	0.420	0.959	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	359	0.079	0.212	0.420	0.959	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	360	0.079	0.202	0.420	0.959	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	361	0.145	0.238	0.535	1.067	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	362	0.145	0.238	0.535	1.067	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	363	0.145	0.238	0.535	1.067	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	364	0.093	0.189	0.333	0.763	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	365	0.086	0.189	0.305	0.811	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	366	0.086	0.189	0.305	0.811	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	367	0.086	0.189	0.305	0.811	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	368	0.149	0.249	0.520	1.132	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	369	0.149	0.249	0.520	1.132	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	370	0.071	0.200	0.328	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	371	0.071	0.200	0.328	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	372	0.071	0.200	0.328	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	373	0.071	0.200	0.328	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	374	0.071	0.200	0.328	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	375	0.189	0.200	0.328	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	376	0.084	0.201	0.475	1.094	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	377	0.084	0.201	0.475	1.094	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	378	0.084	0.201	0.475	1.094	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	379	0.084	0.201	0.474	1.094	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	380	0.084	0.201	0.474	1.094	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	381	0.084	0.201	0.474	1.094	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	382	0.148	0.299	0.321	1.112	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	383	0.148	0.299	0.321	1.112	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	384	0.153	0.314	0.546	1.333	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	385	0.153	0.314	0.546	1.333	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	386	0.153	0.314	0.546	1.333	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	387	0.153	0.314	0.546	1.333	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

B	388	0.153	0.314	0.546	1.333	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	389	0.085	0.192	0.319	0.685	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	390	0.085	0.192	0.319	0.685	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	391	0.085	0.192	0.319	0.685	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
B	392	0.113	0.271	0.478	1.046	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

3. Solución Tipo C. Resultados

CLAVE	LOTE	ESTANDAR DE ENDOTOXINA EN PICOGRAMOS (ABSORBENCIAS)				LAL	CONEJOS
		NEG.	12	50	200		
C	1	0.068	0.184	0.343	0.721	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	2	0.081	0.191	0.340	0.749	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	3	0.081	0.191	0.340	0.749	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	4	0.081	0.191	0.340	0.749	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	5	0.023	0.122	0.272	0.496	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	6	0.023	0.122	0.272	0.496	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	7	0.023	0.122	0.272	0.496	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	8	0.023	0.122	0.272	0.496	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	9	0.023	0.122	0.272	0.496	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	10	0.023	0.122	0.272	0.496	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	11	0.023	0.122	0.272	0.496	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	12	0.023	0.122	0.272	0.496	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	13	0.023	0.122	0.272	0.496	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	14	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	15	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	16	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	17	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	18	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	19	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	20	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	21	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	22	0.081	0.191	0.340	0.749	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

C	23	0.081	0.191	0.340	0.749	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	24	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	25	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	26	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	27	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	28	0.071	0.199	0.464	0.897	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	29	0.025	0.190	0.310	0.695	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	30	0.028	0.191	0.315	0.714	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	31	0.028	0.191	0.315	0.714	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	32	0.028	0.191	0.315	0.714	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	33	0.111	0.219	0.378	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	34	0.111	0.219	0.378	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	35	0.111	0.219	0.378	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	36	0.111	0.219	0.378	0.931	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	37	0.097	0.170	0.319	0.723	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	38	0.125	0.236	0.499	0.890	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	39	0.125	0.236	0.499	0.890	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	40	0.125	0.236	0.499	0.890	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	42	0.125	0.236	0.499	0.890	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	43	0.079	0.210	0.356	0.846	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	44	0.125	0.236	0.499	0.840	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	45	0.125	0.236	0.499	0.840	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	46	0.079	0.210	0.346	0.846	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	47	0.079	0.210	0.346	0.846	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	48	0.079	0.210	0.346	0.846	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	49	0.079	0.210	0.346	0.846	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	50	0.079	0.210	0.346	0.846	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

C	51	0.072	0.194	0.307	0.701	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	52	0.072	0.194	0.307	0.701	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	53	0.072	0.194	0.307	0.701	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	54	0.072	0.194	0.307	0.701	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	55	0.075	0.190	0.310	0.649	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	56	0.075	0.190	0.310	0.649	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	57	0.144	0.219	0.490	0.717	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	58	0.028	0.191	0.315	0.714	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	59	0.101	0.208	0.413	0.801	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	60	0.101	0.208	0.413	0.801	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	61	0.101	0.208	0.413	0.801	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	62	0.101	0.208	0.413	0.801	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	63	0.101	0.208	0.413	0.801	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	64	0.101	0.208	0.413	0.801	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	65	0.101	0.208	0.413	0.801	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	66	0.101	0.208	0.413	0.801	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	67	0.077	0.216	0.409	0.748	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	68	0.077	0.216	0.409	0.748	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	69	0.077	0.216	0.409	0.748	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	70	0.055	0.184	0.399	0.783	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	71	0.055	0.184	0.399	0.783	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	72	0.055	0.184	0.399	0.783	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	73	0.055	0.184	0.399	0.783	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	74	0.055	0.184	0.399	0.783	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	75	0.055	0.184	0.399	0.783	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	76	0.055	0.184	0.399	0.783	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	77	0.055	0.184	0.399	0.783	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

C	78	0.055	0.184	0.399	0.763	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	79	0.093	0.195	0.366	0.773	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	80	0.093	0.195	0.366	0.773	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	81	0.093	0.195	0.366	0.773	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	82	0.093	0.195	0.366	0.773	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	83	0.093	0.195	0.366	0.773	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	84	0.093	0.195	0.366	0.773	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	85	0.093	0.195	0.366	0.773	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	86	0.084	0.195	0.310	0.715	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	87	0.084	0.195	0.310	0.715	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	88	0.089	0.192	0.326	0.863	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	89	0.089	0.192	0.326	0.863	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	90	0.089	0.192	0.326	0.863	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	91	0.089	0.192	0.326	0.863	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	92	0.105	0.238	0.420	0.780	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	93	0.105	0.238	0.420	0.780	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	94	0.105	0.238	0.420	-0.780	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	95	0.105	0.238	0.420	0.780	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	96	0.105	0.238	0.420	0.780	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	97	0.105	0.238	0.420	0.780	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	98	0.087	0.189	0.430	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	99	0.087	0.189	0.430	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	100	0.087	0.189	0.430	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	101	0.087	0.189	0.430	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	102	0.087	0.189	0.430	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	103	0.096	0.202	0.392	0.712	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	104	0.096	0.202	0.392	0.712	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

C	105	0.096	0.202	0.392	0.712	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	106	0.096	0.202	0.392	0.712	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	107	0.084	0.195	0.319	0.718	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	108	0.072	0.254	0.395	0.761	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	109	0.072	0.254	0.395	0.761	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	110	0.072	0.254	0.395	0.761	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	111	0.072	0.254	0.395	0.761	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	112	0.075	0.179	0.321	0.754	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	113	0.075	0.179	0.321	0.754	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	114	0.075	0.179	0.321	0.754	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	115	0.075	0.179	0.321	0.754	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	116	0.075	0.179	0.321	0.754	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	117	0.075	0.179	0.321	0.754	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	118	0.075	0.179	0.321	0.754	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	119	0.052	0.189	0.341	0.719	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	120	0.052	0.189	0.341	0.719	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	121	0.087	0.202	0.430	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	122	0.087	0.202	0.430	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	123	0.087	0.202	0.430	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	124	0.087	0.202	0.430	0.812	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	125	0.105	0.238	0.420	0.780	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	126	0.105	0.238	0.420	0.780	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	127	0.105	0.238	0.420	0.780	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	128	0.060	0.189	0.328	0.831	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	129	0.060	0.189	0.328	0.831	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	130	0.060	0.189	0.328	0.831	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	131	0.073	0.200	0.355	0.834	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

C	132	0.060	0.189	0.328	0.831	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	133	0.060	0.189	0.328	0.831	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	134	0.060	0.189	0.328	0.831	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	135	0.060	0.189	0.328	0.831	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	136	0.060	0.189	0.328	0.831	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	137	0.060	0.189	0.328	0.831	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	138	0.111	0.239	0.396	0.865	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	139	0.111	0.239	0.396	0.865	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	140	0.111	0.239	0.396	0.865	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	141	0.111	0.239	0.396	0.865	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	142	0.111	0.239	0.396	0.865	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	143	0.111	0.239	0.396	0.865	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	144	0.111	0.239	0.396	0.865	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	145	0.111	0.239	0.396	0.865	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	146	0.083	0.195	0.302	0.884	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	147	0.080	0.191	0.307	0.767	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	148	0.080	0.191	0.307	0.767	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	149	0.080	0.191	0.307	0.767	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	150	0.080	0.191	0.307	0.767	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	151	0.095	0.227	0.453	0.974	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	152	0.095	0.227	0.453	0.974	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	153	0.095	0.227	0.453	0.974	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	154	0.095	0.227	0.453	0.974	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	155	0.095	0.227	0.453	0.974	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	156	0.095	0.227	0.453	0.974	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	157	0.095	0.227	0.453	0.974	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	158	0.095	0.227	0.453	0.974	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

C	159	0.095	0.227	0.453	0.974	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	160	0.051	0.180	0.335	0.706	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	161	0.051	0.180	0.335	0.706	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	162	0.051	0.180	0.335	0.706	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	163	0.067	0.184	0.374	0.928	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	164	0.067	0.184	0.374	0.928	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	165	0.067	0.184	0.374	0.928	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	166	0.112	0.212	0.440	0.958	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	167	0.112	0.212	0.440	0.958	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	168	0.112	0.212	0.440	0.958	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	169	0.112	0.212	0.440	0.958	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	170	0.112	0.212	0.440	0.958	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	171	0.108	0.210	0.429	0.899	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	172	0.070	0.198	0.387	0.867	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	173	0.070	0.198	0.387	0.867	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	174	0.070	0.198	0.387	0.867	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	175	0.070	0.198	0.387	0.867	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	176	0.112	0.210	0.362	0.858	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	177	0.166	0.285	0.527	1.237	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	178	0.166	0.285	0.527	1.237	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	179	0.166	0.285	0.527	1.237	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	180	0.145	0.234	0.535	1.067	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	181	0.108	0.195	0.401	0.836	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	182	0.108	0.195	0.401	0.836	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	183	0.108	0.195	0.401	0.836	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	184	0.108	0.195	0.401	0.836	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	185	0.091	0.208	0.391	1.002	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

C	186	0.091	0.208	0.391	1.002	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	187	0.141	0.291	0.615	1.209	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	188	0.141	0.291	0.615	1.209	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	189	0.141	0.291	0.615	1.209	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	190	0.141	0.291	0.615	1.209	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	191	0.141	0.291	0.615	1.209	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	192	0.141	0.291	0.615	1.209	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	193	0.141	0.291	0.615	1.209	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	194	0.141	0.291	0.615	1.209	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	195	0.141	0.291	0.615	1.209	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	196	0.077	0.216	0.409	0.748	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	197	0.095	0.227	0.453	0.974	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	198	0.091	0.208	0.391	1.002	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	199	0.091	0.208	0.391	1.002	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO
C	200	0.091	0.208	0.391	1.002	NO PIROGENICO	NO PIROGENICO

CAPITULO IV

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Como ya se mencionó en la parte experimental, los criterios para la interpretación de resultados son los siguientes:

- Interpretación de resultados en prueba por conejos. La prueba se realiza en tres conejos. Ningún conejo debe presentar un incremento de 0.6°C ó más. La suma de incrementos de temperatura de los tres conejos, debe ser menor de 1.4° . Si un conejo presenta un incremento de 0.6°C ó más, o dos conejos presentan un incremento de 0.4°C , se debe retirar la prueba con cinco conejos.
- Interpretación de resultados en prueba por LAL. Todas las muestras de prueba deben tener valores de absorbancia menores que los obtenidos en el estándar de 50 pg/ml. El promedio de los valores del control negativo, debe ser menor de 0.2 unidades de absorbancia. La diferencia entre absorbancia del control negativo y la absorbancia del estándar de 50 pg/ml debe ser de por lo menos de 0.2 unidades. Debe haber un mínimo de 0.2 unidades de absorbancia entre la diferencia de absorbancia en el estándar de 50 pg/ml y en el estándar de 200 pg/ml. (37)

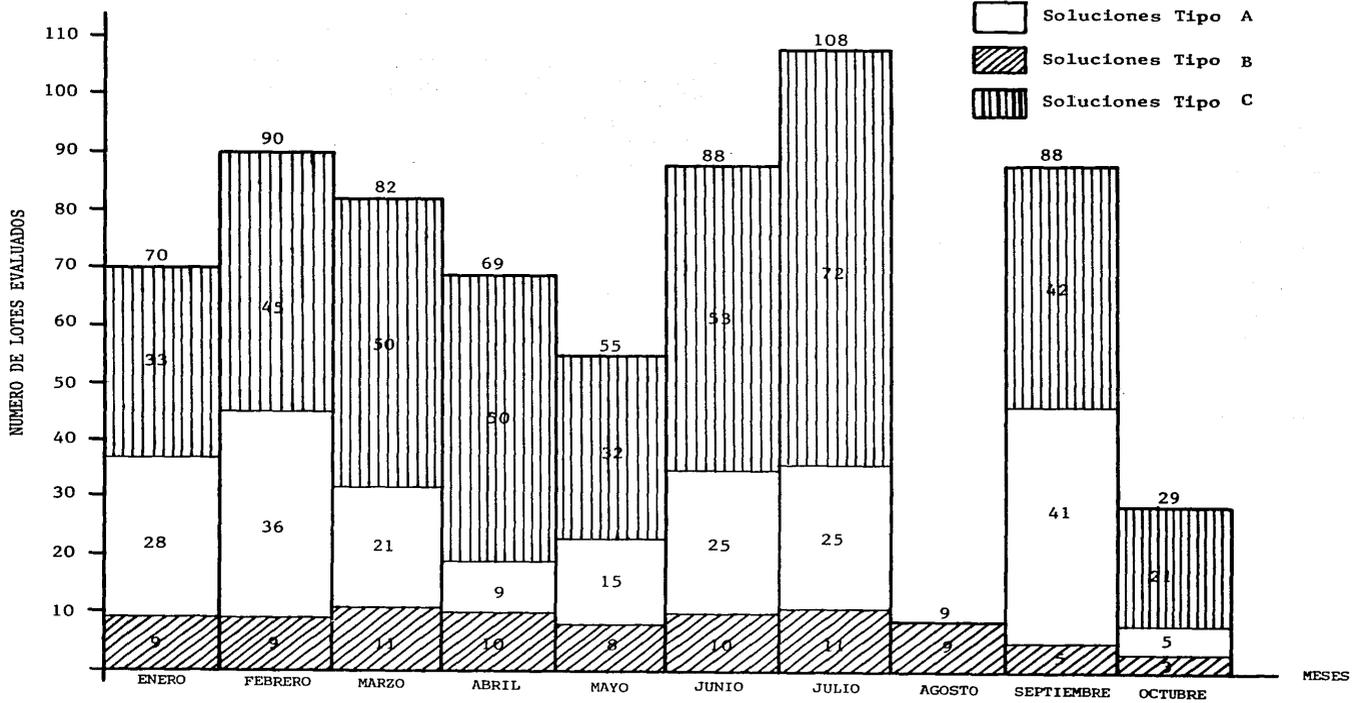
Discusión

1. En la gráfica 1, se muestra la cantidad de pruebas realizadas por mes haciendo diferencia en las barras de acuerdo al tipo de producto farmacéutico.

2. En las gráficas 2,3 y 4 se muestran en forma comparativa mes a mes los lotes probados por ambas técnicas de las soluciones A, B y C respectivamente, en las que se puede observar la coincidencia en el 100% de los resultados obtenidos, lo que valida indiscutiblemente la técnica de LAL para evaluar pirógenos en ciertos productos farmacéuticos.
3. El promedio de coeficientes de correlación lineal obtenidas de las curvas estándar para la prueba de LAL en cada día de trabajo, fueron los que se indican a continuación:
 - a) Para Soluciones A:
Correlación = 0.9810
 - b) Para Soluciones B:
Correlación = 0.9809
 - c) Para Soluciones C:
Correlación = 0.9722

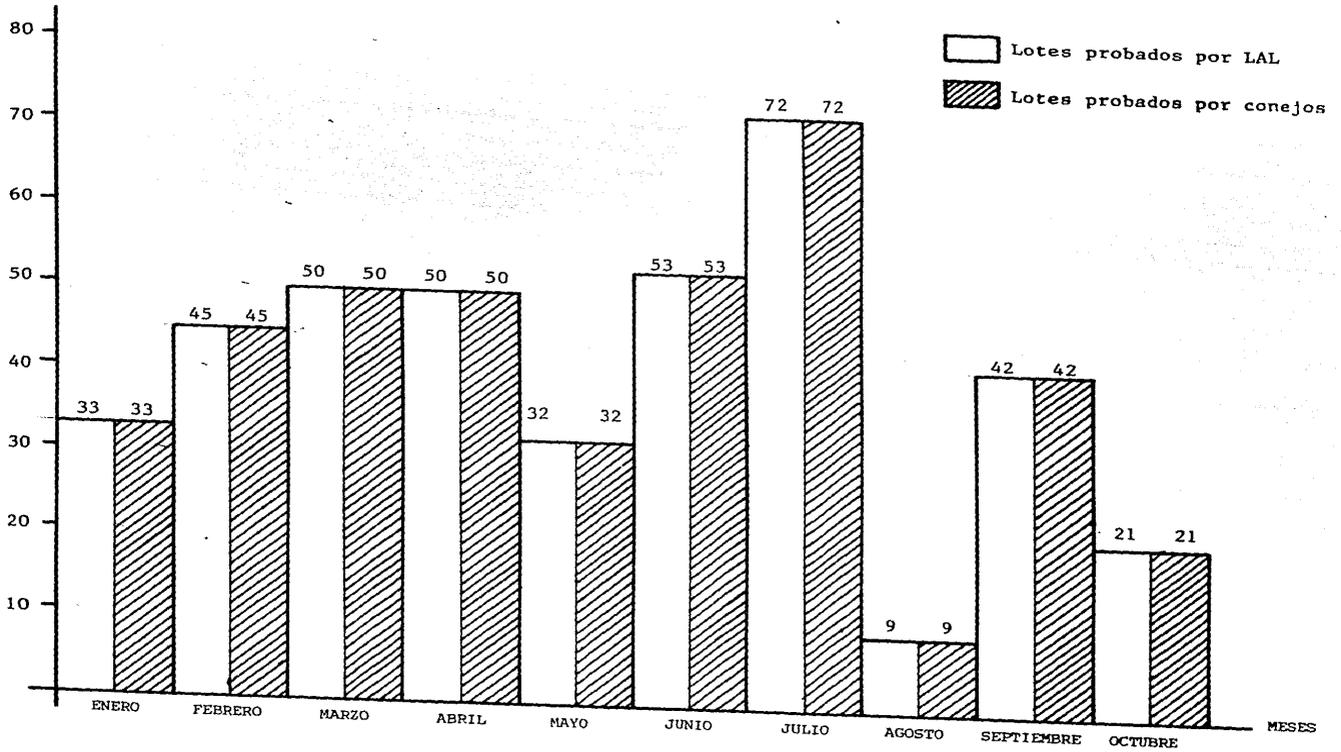
Mismas que fueron obtenidas aplicando las fórmulas estadísticas conocidas, en las cuales indican una muy buena correlación lineal entre las diferentes concentraciones y las unidades de absorbancia obtenidas para cada lote.

NUMERO DE LOTES EVALUADOS v.s. MES



GRAFICA 1

SOLUCIONES TIPO "B"

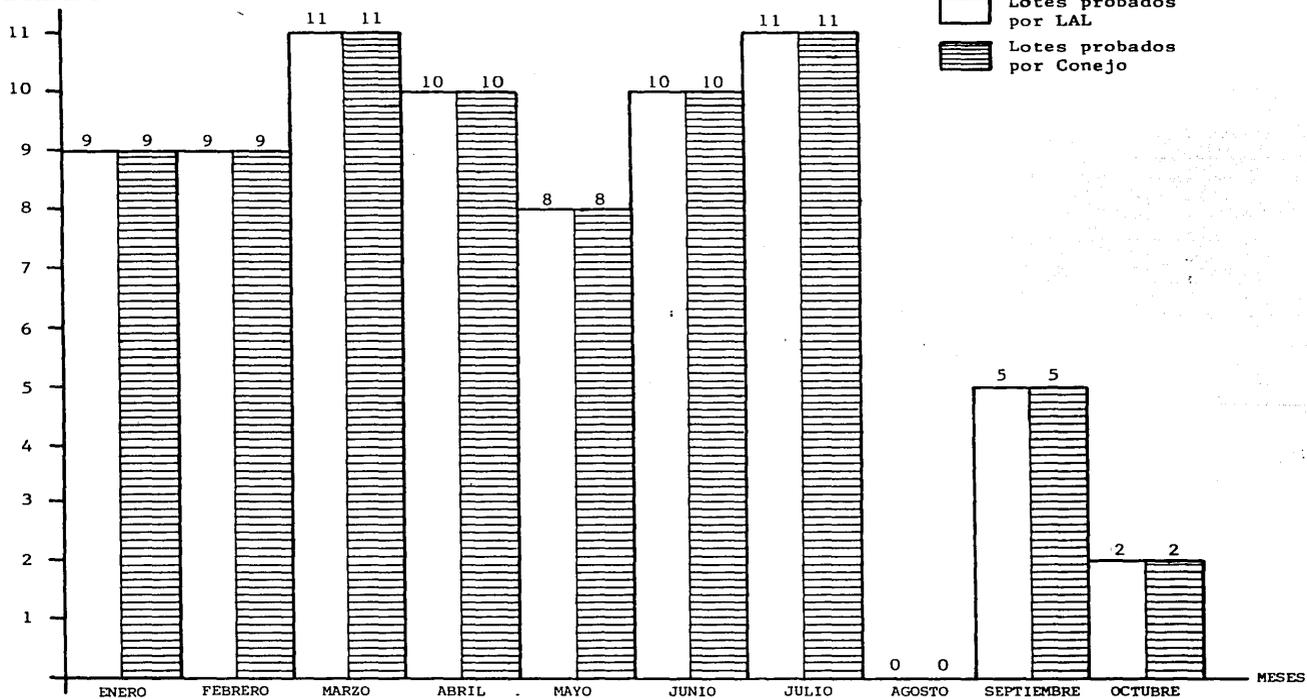


GRÁFICA 3

NUMERO DE LOTES APROBADOS NO PIROGENICOS POR LAL Y POR CONEJOS v.s. MES

SOLUCIONES TIPO "A"

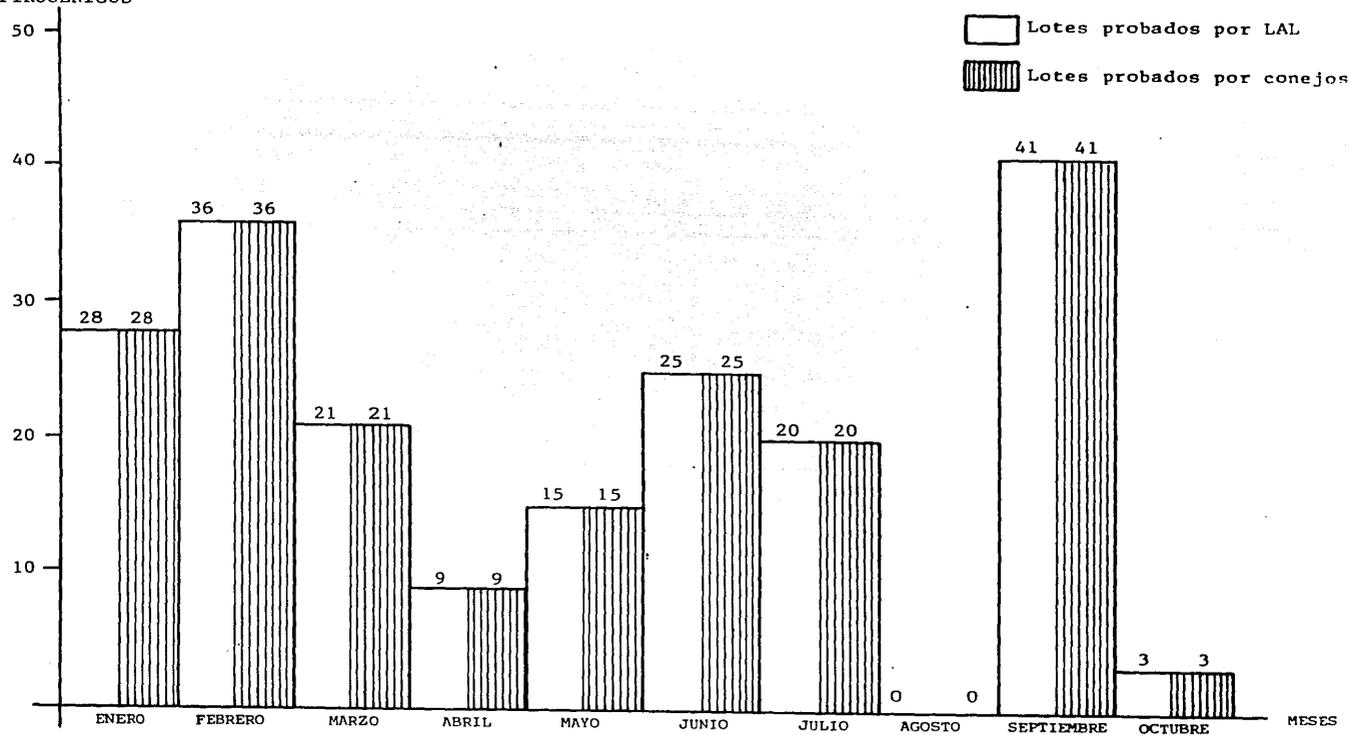
NUMERO DE LOTES
APROBADOS NO
PIROGENICOS



NUMERO DE LOTES APROBADOS NO PIROGENICOS POR LAL Y POR CONEJOS v.s. MES

SOLUCIONES TIPO "C"

NUMERO DE LOTES
APROBADOS NO
PIROGENICOS



GRAFICA 4

CAPITULO V

RESUMEN

La evaluación comparativa de más de 600 lotes de producto farmacéutico para valorar pirógenos por los métodos de detección de pirógenos en conejos y la detección de endotoxinas bacterianas por LAL, proporcionaron datos concluyentes respecto a la validez y superioridad de la técnica de LAL sobre la tradicional técnica en conejos para este tipo de productos farmacéuticos, debido a su versatilidad para emplearse como prueba cuantitativa o semi-cuantitativa, y por la posibilidad de valorar una gran cantidad de muestras en una sola corrida, reduciendo así en gran medida tiempo y costo comparado con la prueba en conejos.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

La prueba de detección de endotoxinas bacterianas por LAL ha demostrado ser una magnífica alternativa a la prueba de detección de pirógenos por conejos, ya que aunque no es de aplicación universal en los productos parenterales y materias primas aquí mencionadas, resulta ser satisfactoria esencialmente por:

1. Ser más económica, por la oportunidad de manejar un mayor número de muestras en el período de determinación comparado con la determinación de pirógenos en conejos; además, del terrible gasto que representa el mantenimiento de un bioterio, tanto en material y equipo como personal adiestrado necesario para realizar la prueba en conejos.
2. Ser más controlable, ya que depende mucho menos de factores ambientales que la determinación de pirógenos en conejos; además, de no depender de factores de estrés del animal que impiden definitivamente que el método pueda ser preciso ni aún bajo el mejor control de los parámetros de la prueba.
3. Ser más sensible, por su propia naturaleza y tipo de equipo que se utiliza para la determinación de la misma.
4. Ser más versátil, ya que debido a su cualidad de poder ser cuantitativa o semicuantitativa, según el grado de precisión deseado, puede emplearse como una herramienta de control de proceso para valorar los niveles de endotoxina presentes en los procedimientos de manufactura.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

1. Jorgensen JH, Lee JC, Pharen HR, Applied Environmental Microbiology, 32 N° 3, pág. 347-351, (1976).
2. Bernheimer AW, Mechanisms in Bacterial Toxicology, Ed. Pub. John Wiley & Sons, Inc. (1976).
3. Nakamura S, Iwanaga S, Harada T, Niwa M, Biochem 80 N° 5, pág. 1011-1021, (1976).
4. Nakamura S, Takagi T, Iwanaga S, Niwa M, Takahashi K, J. Biochem 80 N° 3, pág. 649-652, (1976).
5. Ward PA, Hill JH, Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 141, pág. 898-900, (1972).
6. Jorgensen JH, Carvajal HL, Chipps BE, Smith RF, Applied Microbiology, American for Microbiology, 26, pág. 38-42, (1973).
7. Mulhern FJ, Code of Federal Regulations (CFR) 21 Parte 273, (1973).
8. Randolph WF, Federal Register, 42 N° 213, pág. 57749-57750, (1977).
9. Dubczak JA, Cotter R, Dastoli FR, Biomedical Applications for the Horseshoe Crab (Limulidae), Alan R. Liss, Inc. pág. 403-414, (1979).
10. Weary M, Baker B, Bulletin of the Parenteral Drug Association, 31 N° 3, pág. 127-133, (1977).
11. Yin ET, Galanos C, Kinsky S, Bradsyam RA, Wessler S, Luderitz O, Sarmiento ME, Biochim Biophys, 261, pág. 284-289, (1972).
12. Garratt DC, Hartley RE y Hussett MV, The Pharmaceutical Journal, pág. 112, 116, (1981).
13. Jorgensen JH, Smith RF, Applied Microbiology, N° 26, 1 pág. 521-524

14. Martínez LA, Quintiliani R, Tilton RC, The Journal of Infectious Diseases 127, N° 1, pág. 102-105, (1973).
15. Mascoli C, Weary ME, Parenteral Association, pág. 81-95, (1979).
16. Peñaloza Ayala Efrain, Tesis Profesional, Purificación de la Toxina Termoestable. Escherichia coli, UNAM, México, (1983).
17. Pintado Morales María Ester, Tesis Profesional, El Método para Detectar Pirógenos en Conejos y Pruebas de Lisado de Amebocitos de Limulus, UNAM, México, (1979).
18. Vázquez Barroso Graciela, Tesis Profesional, Revisión Bibliográfica sobre Pirógenos, UNAM, México, (1979).
19. Alvarez Galván Mónica y Vargas Hernández Lilia, Tesis Profesional, Aislamiento y Caracterización de Cepas-endotoxigénicas de Escherichia coli, UNAM, México (1984).
20. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. Cuarta Edición, (1979).
21. Crisman SE, Hormide RB, Poul Soc. Exp. Bio. Med. (131), (1969).
22. Limulus Amebocyte Lysate, 1973 Federal Register 381404.
23. Limulus Amebocyte Lysate, 1977 Federal Register 42 57749.
24. Weary M, Baker B, Boul Parent Assoc. 31, 127, (1977).
25. Reinhold RB and Fire J, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 334, (1971).
26. Humphery JH and Banglham Dr, Bull World Health Organ 20, 1241, (1959).
27. Simons S, Toth M, Wallerstein G and Remery Z. J. Pharm, pharmacol 28 (1), (1976).
28. J. Parenter, Drug Assoc. 34, 212, (1960).
29. US Food and Drug Administration "Biological product. Fed. Register 38, 26130, (1973).
30. US Food and Drug Administration "Biological product. Fed. Register 4223167, (1977).
31. US Food and Drug Administration "Biological product. Fed. Register 4335731, (1978).

32. Flores Galván Sergio Arturo, Tesis Profesional, Validación de la Prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus como un Método Alternativo no Oficial para Determinar Endotoxinas en Diferentes Productos Farmacéuticos, UNAM, México, (1985).
33. Pearson FC, Wary M, Journal of the Parenteral Drug Association 34 N^o 2, pág. 103-108, (Marzo-abril 1980).
34. Pearson FC, Wary M, Bioscience, 30 N^o 7, pág. 461-464, (1980).
35. Weary ME, Donohve G, Pearson FC, Story Kenneth Applied and Environmental Microbiology, pág. 1148-1151, (1980).
36. Pearson FC, Pyrogen Short Course, Laboratorios Travenol, Morton Grove Illinois, (1981). (Para consulta en las instalaciones de Baxter-Travenol y sus subsidiarias).
37. Travenol Laboratories, Inc. Especificación 13-I-D, Limulus Amebocyte Lysate Test of Pyrogenicity Optical Density Procedure, (1986). (Para consulta en las instalaciones de Baxter-Travenol y sus subsidiarias).
38. Lehninger L. Albert, Bioquímica 7a. Reimpresión, pág. 311,312, (1983).
39. Davis, Dulbecco, Eisen, Ginsberg, Wood, Tratado de Microbiología, Reimpresión 1983, pág. 661,785-790
40. Takashi Morita, Takanori Nakamura, Toshiyuki Miyata, and Sadaaki Iwanaga, Takashi M, Takanori N, Toshiyuki M, Sadaaki I, Bacterial Endotoxins: Structure Biomedical Significance, and Detection With the Limulus Amebocyte Lysate Test, p. 53-64, (1985).

CAPITULO VIII

APENDICE

DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA

Material y Reactivos

1. Estufa (250°C)
2. Balanza analítica con precisión de 0.001 g.
3. Baño de agua (37°C).
4. Centrífuga (2,600 rpm, para emulsión de lípidos 12,000 rpm).
5. Espectrofotómetro de flujo continuo.
6. Vortex.
7. Pipetas de 200 y 100 microlitros.
8. Papel parafilm.
9. Papel aluminio.
10. Bomba de vacío.
11. Cronómetro.
12. Reloj de tiempo para centrífuga.
13. Pinzas despirogenizadas.
14. Pipetas estériles despirogenizadas de 0.1, 0.2 y 1.5 ml
15. Tubos de vidrio 12 x 12 cerrados despirogenizados RTU 7810.
16. Jeringas desechables de 1 ml despirogenizadas.
17. Matraces volumétricos de 100, 500 y 1,000 ml.
18. Matraces Erlenmeyer de 50, 100 y 125 ml.
19. Probetas de 100 ml graduadas.

Todo el material de vidrio excepto los tubos RTU, deben ser enjuagados con agua destilada dos veces y despirogenizados a 250°C por 60 minutos. El material usado para la determinación de proteínas no requiere despirogenizarse.

Reactivos

1. Liofilizado de LAL, se mantiene a 2-8°C. Cada nuevo lote debe ser validado con el lote anterior. El liofilizado se reconstituye con 3 ml de una solución recién preparada de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0.5% (W/V).
2. $CuSO_4$ (W/V) al 0.5% en agua destilada despirogenizada.
3. Na_2CO_3 al 2% (W/V), $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ al 0.02% (W/V) en NaOH 0.1N, desechar semanalmente.
4. Solución de trabajo de Lowry. En un matraz aforado de 50 ml adicione 1 ml de la solución preparada de $CuSO_4$ y afore con la solución preparada de tartrato; usar y desechar el resto.
5. Solución de trabajo de Folin Ciocalteu. En un matraz aforado de 50 ml agregar 25 ml de agua destilada despirogenizada y aforar con el reactivo de Folin (es fotoreactivo), mantener a temperatura ambiente y en la obscuridad; preparar diariamente.
6. NaOH 0.75 N.
7. Stock de proteína humana estándar (HSA). El stock de HSA mensual requiere una concentración de 0.8 g de HSA por 100 ml de agua destilada, mantener a 2-8°C. El stock quincenal se prepara con 1 ml del stock mensual y se afora con NaOH 0.75 N.

Diluir el estándar de trabajo quincenal 1:2, 1:4 y 1:8 con NaOH 0.75H para obtener 80 µg, 40 µg y 20 µg/0.2 ml respectivamente.

8. Preparación de la endotoxina estándar. La endotoxina es reconstituida con 2 ml de agua despirogenizada, se mezcla bien y se deja reposar por 12 horas, se toma 1 ml y se afora con agua destilada a 100 ml. La concentración aproximada es de 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$; endotoxina mensual.

La endotoxina para uso semanal, se prepara con 1 ml de la endotoxina mensual y se lleva a 500 ml con agua despirogenizada, lo que da una concentración de 0.01 a 0.05 $\mu\text{g/ml}$.

La curva estándar de endotoxina se hace siempre que se lleve a cabo la prueba, preparando concentraciones de 200 pg/ml , 50 pg/ml y 12 pg/ml . Como diluyente se usa un lote de la misma formulación química, que se está probando y debe estar calificada para la prueba de LAL.

9. Control negativo. La solución usada para preparar la curva de endotoxina, se puede usar como control negativo.