



## Lisado de amebocitos de Limulus (LAL) Kinetic-QCL™

# Contenido

Sección	N.º de página	
1	Propósito de uso	2
1	Advertencias	2
1	Explicación de la prueba	3
2	Principio	4
2	Reactivos suministrados y condiciones de conservación	5
3	Materiales y equipo no suministrados	6
4	Recogida y preparación de muestras	8
4	Tipos de ensayos Kinetic-QCL™	9
5	Preparación de los reactivos	11
6	Procedimiento de la prueba	14

Sección	N.º de página	
7	Características de rendimiento	16
7	Cálculo de la concentración de endotoxinas	17
8	POWERCURVE™	20
9	Inhibición del producto	22
9	Limitaciones e indicaciones	25
9	Muestras coloreadas	25
10	Curva patrón archivada	26
10	Correlación con otros métodos	27
10	Nota para nuestros clientes internacional	27
11	Referencias	28

**Importante: Lea detenidamente este documento antes de realizar las pruebas.**

## Propósito de uso

Este producto está diseñado para el análisis *in vitro* para la detección de endotoxinas en un producto final, en medicamentos parenterales, productos biológicos y dispositivos médicos para animales y humanos. Este producto no está indicado para la detección de endotoxinas en muestras clínicas o como ayuda en el diagnóstico de una enfermedad humana. Esta prueba utiliza una preparación de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) en combinación con un lector de microplacas con incubación y el software adecuado, con el fin de detectar la endotoxina fotométricamente.

La Farmacopea señala procedimientos que se consideran necesarios para:

1. Establecer límites de endotoxina para productos farmacéuticos y para dispositivos médicos;
2. Validar el uso de LAL como prueba de detección de endotoxina como producto final; y
3. Desarrollar un protocolo de pruebas rutinario.<sup>8</sup>

Los procedimientos aquí descritos están basados en las pautas Farmacopeicas.

## Advertencias, leer detenidamente

Solo para uso diagnóstico *in vitro*. El ensayo Kinetic-QCL™ no está diseñado para detectar endotoxemia en el ser humano. La prueba LAL puede sustituirse por la prueba de pirógenos de la USP (Farmacopea Estadounidense) en conejos cuando se utiliza según las pautas Farmacopeicas para análisis de productos finales en medicamentos parenterales, productos biológicos y dispositivos médicos para animales y humanos<sup>8</sup>.

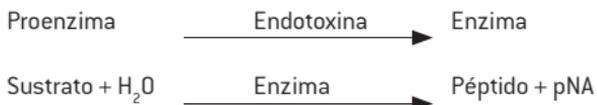
## Explicación de la prueba

Kinetic-QCL™ es un ensayo cinético y cuantitativo para la detección de endotoxina bacteriana gram negativa. Se mezcla una muestra con el reactivo LAL/sustrato, se coloca en el lector de microplacas de incubación y se supervisa automáticamente a lo largo del tiempo para detectar la aparición de un color amarillo. El tiempo necesario antes de la aparición del un color amarillo (tiempo de reacción) es inversamente proporcional a la cantidad de endotoxina existente. Es decir, con la presencia de una gran cantidad de endotoxina, la reacción aparece rápidamente, pero con una pequeña cantidad de endotoxina, aumenta el tiempo de reacción. La concentración de endotoxina en muestras desconocidas puede calcularse a partir de una curva patrón.

La utilización de LAL para la detección de endotoxinas evolucionó a partir de la observación realizada por Bang<sup>1</sup> en la que infección por bacterias gram negativas en *Limulus polyphemus*, el cangrejo herradura, causó una coagulación intravascular mortal. Levin y Bang<sup>2,3</sup> demostraron posteriormente que esta coagulación fue el resultado de una reacción entre la endotoxina y una proteína coagulable en los amebocitos circulantes de *Limulus*. A partir del desarrollo de un anticoagulante adecuado para la sangre de *Limulus*, Levin y Bang<sup>4</sup> prepararon un lisado a partir de amebocitos lavados, lo cual fue un indicador extremadamente sensible de la presencia de endotoxinas. Solum<sup>5,6</sup> y Young, Levin y Prendergast<sup>7</sup> han purificado y caracterizado la proteína coagulable de LAL y han demostrado que la reacción con endotoxina es enzimática.

El método actual de LAL utiliza la parte inicial de la reacción de la endotoxina de LAL para activar una enzima, que, a su vez, libera p-nitroanilina (pNA) desde un sustrato sintético, lo que produce un color amarillo.

## Principio



Las endotoxinas de bacterias gram negativas catalizan la activación de la proenzima en el LAL<sup>7</sup>. La tasa inicial de activación viene determinada por la concentración de endotoxina presente. La enzima activada cataliza la liberación de pNA del sustrato incoloro Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. La pNA libre se mide fotométricamente, a 405 nm de forma continua durante todo el período de incubación. La concentración de endotoxinas en una muestra se calcula comparando su tiempo de reacción con una curva patrón.

## Reactivos suministrados y condiciones de almacenamiento

### Reactivo Kinetic-QCL™ (K50-643) Vial con etiqueta amarilla

Cada vial contiene una mezcla liofilizada de lisado, preparada a partir de los amebocitos circulantes del cangrejo herradura, *Limulus polyphemus* y del sustrato cromógeno.

**Reconstitúyalo inmediatamente antes de su utilización con 2,6 ml de agua reactivo LAL por vial.** Si se necesitaran más de un vial, junte dos o más viales antes del uso. Agítelos con movimientos circulares suaves para evitar la formación de espuma. El reactivo Kinetic-QCL™ liofilizado debe conservarse a 2-8 °C. Protéjalo de la exposición prolongada a la luz.

El reactivo Kinetic-QCL™ reconstituido debe usarse cuanto antes. El reactivo Kinetic-QCL™ reconstituido es estable durante 8 horas a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C, o puede conservarse a -10 °C o menos hasta dos semanas. Congele y descongele una sola vez.

### Endotoxina 055:B5 *E. coli* (E50-643) Vial con etiqueta roja

El volumen de reconstitución del vial figura en el Certificado de análisis y se calcula para crear una solución que contenga 50 UE (o UI)/ml. Reconstitúyalo con el volumen especificado de agua reactivo LAL. Agítelo energicamente durante al menos 15 minutos a alta velocidad en un agitador tipo vórtex. Antes de su posterior utilización, permita a la solución madre conservada que alcance la temperatura ambiente y mezclar con el agitador tipo vórtex durante 15 minutos. Esto es importante porque la endotoxina tiende a pegarse al vidrio. El certificado de análisis está disponible en [www.lonza.com/coa](http://www.lonza.com/coa).

La endotoxina 055:B5 de *E. coli* liofilizada debe conservarse a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C. La endotoxina madre reconstituida es estable durante cuatro semanas a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.

**Nota:** En los kits que solo contienen lisado no se incluye la endotoxina, pero se requiere para su uso.

La endotoxina se incluye para mayor comodidad del usuario. Pueden utilizarse otras preparaciones de endotoxina para preparar los patrones, pero debe determinarse su rendimiento en el ensayo cromógeno respecto a la endotoxina patrón de referencia (EPR).

### **Agua reactivo LAL (W50-640) Vial con etiqueta amarilla**

Cada vial contiene 30 ml de agua reactivo LAL. Este agua debe utilizarse para rehidratar el reactivo Kinetic-QCL™ y la endotoxina de *E. coli* y para preparar la endotoxina y las diluciones de la muestra. El agua reactivo LAL es equivalente al agua para la prueba de endotoxinas bacterianas (PEB).

El agua reactivo LAL debe conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C.

**Nota:** No se incluye el agua reactivo LAL, pero se requiere en los kits de solo lisado.

### **Materiales y equipo NO suministrados**

1. Tubos de dilución desechables de vidrio libre de endotoxina [13 × 100 mm, n.º N207 o equivalente].
2. Pipetas serológicas envasadas individualmente.
3. Pipetas manuales automáticas con puntas estériles e individualmente envasadas o en racks.

4. Microplacas estériles desechables.  
**Nota:** Antes del uso rutinario, las microplacas deben haber sido previamente cualificadas<sup>8</sup> (n.º 25-340 o equivalente).
5. Recipientes de reactivos (n.º 00190035 o equivalente).
6. Micropipeta de ocho canales.
7. Hidróxido de sodio, 0,1 N o ácido clorhídrico, 0,1 N, disuelto en agua reactivo LAL para el ajuste de pH de la muestra si fuera necesario.
8. Lector de microplacas (lector IU ELx808™, n.º 25-315 o equivalente).
9. Software WinKQCL™.
10. Temporizador.
11. Agitador tipo vórtex.
12. Para kits sin agua incluida: agua reactivo LAL (n.º W50-640, n.º W50-100, n.º W50-500 o equivalente).
13. Endotoxina patrón (endotoxina control complementaria con el lote de LAL).

## Recogida y preparación de muestras

Debe emplearse una técnica minuciosa para evitar contaminación por endotoxinas o microorganismos. Ningún material que entre en contacto con la muestra o con los reactivos de la prueba debe contener endotoxinas. El material y el equipo de vidrio limpio se pueden eliminar de endotoxinas calentándolo a 250 °C durante 30 minutos. Deben tomarse las precauciones adecuadas para proteger los materiales despirogenados de una posterior contaminación medioambiental.

Por experiencia, la mayoría de pipetas y puntas de pipeta de plástico estériles e individualmente envueltas no contienen endotoxinas. Sin embargo, debe comprobarse estos materiales antes de su uso habitual.

Puede que sea necesario ajustar el pH de la muestra entre 6,0 y 8,0 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico sin endotoxinas. Mida siempre el pH de una alícuota de la muestra para evitar contaminación por el electrodo de pH. No ajuste soluciones no tamponadas.

Las muestras que se vayan a analizar deben conservarse de forma tal que se detenga toda actividad bacteriológica o la concentración de endotoxinas puede aumentar con el tiempo. Por ejemplo, conserve las muestras a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C para períodos inferiores a 24 horas y congélelas para períodos superiores a 24 horas. Es responsabilidad del usuario validar el recipiente adecuado y las condiciones de conservación adecuadas de las muestras.

Si el recipiente del diluyente empleado para rehidratar el reactivo Kinetic-QCL™ se ha abierto previamente o no lo suministra Lonza, debe comprobarse si está contaminado con endotoxinas.

## Tipos de ensayos Kinetic-QCL™

El lector de microplacas de incubación y el software WinKQCL™ son parte integral del ensayo Kinetic-QCL™. Es importante familiarizarse con el funcionamiento del lector de microplacas de incubación y con las funciones del software WinKQCL™. Consulte el lector de microplacas de incubación y los manuales de software WinKQCL™ o la Ayuda para obtener información más detallada.

Existen cuatro (4) tipos básicos de ensayos Kinetic-QCL™, cada uno de los cuales está diseñado para ejecutar un aspecto distinto de la prueba de LAL.

### 1. Rutina

Un ensayo de rutina calcula la concentración de endotoxinas en las muestras desconocidas comparándolas con el rendimiento de una serie de patrones de endotoxina.

Como parte de un ensayo de rutina, el usuario cuenta con la opción de incluir un control positivo del producto (CPP) como supervisión de la inhibición o potenciación del producto (sección 2 a continuación). Un CPP es una muestra del producto a la cual se ha añadido una cantidad conocida de endotoxina. El software WinKQCL™ calcula automáticamente la cantidad de endotoxina recuperada en el CPP, lo que permite comparar con la cantidad conocida de endotoxina añadida.

### 2. Inhibición/Potenciación

La reacción LAL está mediada por enzimas y, como tal, cuenta con un intervalo óptimo de pH y requisitos específicos de cationes divalentes y sales. Ocasionalmente, las muestras a analizar pueden alterar estas condiciones óptimas hasta tal punto que el lisado es insensible a la endotoxina. Los resultados negativos con muestras que inhiben la prueba de LAL no indican necesariamente la ausencia de endotoxina.

Un ensayo de inhibición/potenciación está diseñado para determinar qué nivel de dilución del producto supera la inhibición o la potenciación. Cada dilución del producto debe venir acompañada por un control positivo del producto (CPP). El software WinKQCL™ calcula automáticamente la cantidad de endotoxina recuperada en el CPP, para comparar con la cantidad conocida de endotoxina añadida. Así puede determinarse qué diluciones del producto no interfieren.

### 3. **EPR/EPC**

Un ensayo de EPR/EPC está diseñado para determinar la concentración de una endotoxina patrón de control (EPC) en términos de unidades de concentración de la endotoxina patrón de referencia (EPR).

Este ensayo requiere una serie sencilla de diluciones de la EPR y una o más series de diluciones de la EPC. Según las unidades de concentración de la EPC, el software WinKQCL™ calcula automáticamente los valores medios de concentración en UE/ng o UE/ml. El usuario también puede introducir unidades distintas a UE o ng.

#### 4. Cualificación inicial

Un ensayo de cualificación inicial está diseñado según los requisitos descritos en la Farmacopea<sup>8</sup>. **Este ensayo es necesario como parte de la validación del ensayo de LAL y también se practica con cada nuevo lote de Kinetic-QCL™.**

El ensayo de cualificación inicial realiza una correlación lineal log/log de los valores individuales del tiempo de reacción para cada duplicado de cada patrón de endotoxina. Los otros ensayos emplean el tiempo de reacción promedio de todos los duplicados de cada patrón.

El ensayo de cualificación inicial no admite la inclusión de muestra alguna.

#### Preparación de reactivos

Permita que los reactivos alcancen la a temperatura ambiente antes de su uso.

Con el fin de calcular la concentración de endotoxinas en muestras desconocidas, debe tomarse como referencia para cada prueba de Kinetic-QCL™ una curva patrón válida.

Debido al gran intervalo de concentraciones sobre el que pueden determinarse los valores de endotoxinas, es posible ajustar el intervalo cuantitativo de una prueba dada mediante el ajuste de la concentración de patrones de endotoxina empleados para generar la curva patrón. Es necesario un mínimo de tres patrones.

El ensayo Kinetic-QCL™ se ha optimizado para ser lineal, de 0,005 UE/ml a 50,0 UE/ml. Sin embargo, el usuario individual puede escoger truncar la curva patrón según los requisitos específicos del producto. Los datos indican que truncar una curva patrón de LAL cromógena cinética puede mejorar la precisión de los valores de endotoxina pronosticados en las muestras a analizar. Se recomienda que el usuario esté familiarizado con los requisitos Farmacopeicos sobre las técnicas cinéticas de LAL antes de establecer un intervalo de curva patrón para LAL cinética cromogénica para pruebas rutinarias de muestras de producto<sup>8</sup>.

La siguiente tabla muestra un esquema para la creación de una serie de diluciones de endotoxina a partir de la endotoxina suministrada en el kit. No es necesario emplear todas las diluciones para generar una curva patrón. Pueden emplearse esquemas de dilución alternativos, así como otras endotoxinas no incluidas en este kit. Si la endotoxina empleada no procede de este kit, puede ser necesaria una prueba de EPR/EPC para determinar la potencia de la EPC.

**Nota:** No se recomiendan tubos de plástico para preparar diluciones de endotoxinas.

Concentración de endotoxina (UE/ml)	Volumen de agua reactivo LAL	Volumen de solución de endotoxina añadida al agua reactivo LAL
5,0	0,9 ml	0,1 ml de una solución de 50,0 UE/ml
0,5	0,9 ml	0,1 ml de una solución de 5,0 UE/ml
0,05	0,9 ml	0,1 ml de una solución de 0,5 UE/ml
0,005	0,9 ml	0,1 ml de una solución de 0,05 UE/ml

1. Prepare una solución de 5,0 UE/ml de endotoxina añadiendo 0,1 ml de la endotoxina madre de 50,0 UE/ml en 0,9 ml de agua reactivo LAL dentro de un recipiente adecuado y etiquételo con 5,0 UE/ml. Esta solución debe mezclarse enérgicamente con un agitador tipo vórtex durante al menos 1 minuto antes de comenzar.
2. Transfiera 0,1 ml de la solución de endotoxina de 5,0 UE/ml en 0,9 ml de agua reactivo LAL dentro de un contenedor adecuado y etiquételo con 0,5 UE/ml. Esta solución debe mezclarse enérgicamente con un agitador tipo vórtex durante al menos 1 minuto antes de comenzar.
3. Transfiera 0,1 ml de la solución de endotoxina de 0,5 UE/ml en 0,9 ml de agua reactivo LAL dentro de un recipiente adecuado y etiquételo con 0,05 UE/ml. Esta solución debe mezclarse enérgicamente en un agitadora tipo vórtex durante al menos 1 minuto antes de comenzar.
4. Transfiera 0,1 ml de la solución de endotoxina de 0,05 UE/ml en 0,9 ml de agua reactivo LAL dentro de un recipiente adecuado y etiquételo con 0,005 UE/ml. Esta solución debe mezclarse enérgicamente en un agitador tipo vórtex durante al menos 1 minuto antes de comenzar.

## Procedimiento

Consulte los manuales del lector de microplacas y del software WinKQCL™ para obtener información más detallada sobre la realización de la prueba Kinetic-QCL™.

1. Cree una **plantilla** específica con la que realizar la prueba. Una plantilla contiene el nombre del analista, el tipo de ensayo, los números de lote de los reactivos, el número y la concentración de patrones de endotoxina, el número de duplicados y cómo se organizarán los patrones y las muestras en la microplaca.
2. El **tipo de ensayo** debe seleccionarse como **Kinetic-QCL**. Los siguientes parámetros predeterminados de plantilla no deben cambiarse sin cualificación previa:

t delta (segundos)	150
Filtro de medición (mm)	405
mOD delta	200
Número de lecturas	40

3. Imprima la plantilla para usarla como guía de disposición de los patrones y las muestras en la microplaca.
4. «Ejecute» la plantilla y siga las indicaciones del software WinKQCL™.

5. Dispense con cuidado 100 mcl del blanco del agua reactivo LAL, los patrones de endotoxina, las muestras del producto, los controles positivos del producto (consulte las páginas 22 a 24 para obtener instrucciones de control positivo del producto), etc. en los pocillos correspondientes de la microplaca.
6. Coloque la placa cargada en el lector de microplacas y cierre la tapa.
7. Incube con antelación la placa durante al menos  $\geq 10$  minutos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
8. Hacia el final del período de incubación, reconstituya cada uno de los viales de reactivos Kinetic-QCL™ necesarios, con 2,6 ml de agua reactivo LAL. Mezcle con delicadeza, pero por completo.  
**Nota:** No mezcle en un agitador tipo vórtex el lisado.
9. Mezcle los reactivos en un recipiente de reactivos y mézclelos con cuidado con un movimiento oscilante.
10. Mediante una micropipeta de ocho canales, administre 100 mcl del reactivo Kinetic-QCL™ en todos los pocillos de la microplaca, comenzando por la primera columna (A1-H1) y siguiendo en secuencia hasta la última columna utilizada. Añada reactivo lo más rápido pueda.  
**Nota:** Evite la formación de burbujas.
11. Haga clic de inmediato en el botón OK [Aceptar] del software WinKQCL™ para iniciar la prueba.  
**Nota:** El ensayo Kinetic-QCL™ se ejecuta con la cubierta de la microplaca retirada.

## Características de rendimiento

### Linealidad

Debe verificarse la linealidad de la curva patrón dentro del intervalo de concentración con el que se determinan los valores de endotoxina. Deben analizarse como mínimo por triplicado al menos tres patrones de endotoxina que cubran el intervalo de concentración deseado, así como un blanco de agua reactivo LAL, según los parámetros de prueba de un ensayo de **cualificación inicial**. Deben incluirse patrones adicionales para cubrir cada intervalo de registro a lo largo del intervalo de la curva patrón.

El valor absoluto del coeficiente de correlación ( $r$ ) de la curva patrón calculada debe ser  $\geq 0,980$ .

### Reproductibilidad

Deben analizarse muestras duplicadas para establecer una buena técnica y un bajo coeficiente de variación. El coeficiente de variación (C.V.) equivale a la desviación estándar de los tiempos de reacción de la «muestra» dividida por la media y suele expresarse como porcentaje. El C.V., en %, de los tiempos de reacción de los duplicados debe ser menor del 10 %. Con la experiencia, se deben alcanzar valores entre 3 y 4 %.

## Cálculo de la concentración de endotoxina

Continuamente durante todo el ensayo, el lector de microplacas/software WinKQCL™ monitoriza la absorbancia a 405 nm de cada pocillo de la microplaca. Mediante la lectura inicial de absorbancia de cada pocillo como su propio blanco, el lector determina el tiempo necesario para que la absorbancia aumente a 0,200 unidades de absorbancia. El tiempo se denomina **tiempo de reacción**. El software WinKQCL™ realiza automáticamente una correlación lineal log/log del tiempo de reacción de cada patrón con su correspondiente concentración de endotoxinas. Los parámetros de la curva patrón aparecen en la impresión del informe. Si el valor absoluto del coeficiente de correlación ( $r$ ) es  $\geq 0,980$ , puede emplearse un modelo polinómico para crear una curva patrón y a su vez, predecir las concentraciones de endotoxinas de las muestras a analizar. Este modelo polinómico de ajuste de curvas (POWERCURVE™) es una importante función del software WinKQCL™ (consulte POWERCURVE™, página 20).

### Regresión lineal

La información abajo proporcionada es un ejemplo de cómo el software WinKQCL™ realiza la correlación lineal log/log y calcula las concentraciones desconocidas de endotoxinas en las muestras. No es necesario ejecutar estos cálculos de forma independiente. Para cada muestra de cada producto, el software WinKQCL™ calcula la concentración de endotoxina correspondiente a partir del tiempo de reacción de dicha muestra. El software ajusta automáticamente el valor final del **resultado de la prueba** para tener en cuenta cualquier posible dilución del producto.

## Correlación lineal

### Ejemplos de cálculo

Patrones	Concentración	Tiempo medio de reacción (seg)	Log concentración	Log tiempo medio de reacción
Control negativo	—	Sin reacción	—	—
S1	0,005 UE/ml	4351	-2,30103000	3,63858908
S2	0,05 UE/ml	2496	-1,30103000	3,39724458
S3	0,5 UE/ml	1406	-0,30103000	3,14798532
S4	5,0 UE/ml	895	0,69897000	2,95182304
S5	50,0 UE/ml	561	1,69897000	2,74896286
Muestras				
1	—	1576	—	3,19755621
2	—	943	—	2,97451169

$$\text{Pendiente} = \left( \frac{\sum y}{\sum x} \right) r$$

$$\text{Intersección } Y = \sum y / N - (\sum x / N \times \text{pendiente})$$

$$r = \frac{N \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{N(N-1)S_x S_y}$$

$$\text{Concentración de endotoxina} = \text{antilog} \left[ \frac{\text{tiempo de reacción medio} - \text{intersección } Y}{\text{pendiente}} \right]$$

$x = \log_{10}$  concentración de endotoxina en UE/ml

$y = \log_{10}$  tiempo de reacción medio.

$N$  = Número de patrones utilizados.

$\sum x$  = Suma de  $\log_{10}$  concentración de los patrones utilizados en UE/ml.

$\sum y$  = Suma de  $\log_{10}$  tiempo de reacción.

$\sum xy$  = Suma de  $\log_{10}$  tiempos de concentraciones patrón  $\log_{10}$  tiempos de reacción máx.

$$S_x = \text{Desviación estándar de } x = \sqrt{\frac{N\sum x^2 - (\sum x)^2}{N(N-1)}}$$

$$S_y = \text{Desviación estándar de } y = \sqrt{\frac{N\sum y^2 - (\sum y)^2}{N(N-1)}}$$

**Cálculos con datos de ejemplo:**

$$N = 5$$

$$\begin{aligned} \sum x &= -1,50514998 = (-2,30103000 - 1,30103000 - 0,30103000 \\ &\quad + 0,69897000 + 1,69897000) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum y &= 15,88460488 = (3,63858908 + 3,39724458 + 3,14798532 \\ &\quad + 2,95182304 + 2,74896286) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum xy &= -7,00641653 = (-2,30103000 \times 3,63858908) + (-1,30103000 \times 3,39724458) \\ &\quad + (-0,30103000 \times 3,14798532) \\ &\quad + (0,69897000 \times 2,95182304) \\ &\quad + (1,69897000 \times 2,74896286) \end{aligned}$$

$$S_x = 1,58113883$$

$$S_y = 0,35225503$$

$$r = \frac{5(-7,00641653) - (-1,50514998)(15,88460488)}{5(5-1)(1,58113883)(0,35225503)} = -0,99857152$$

$$\text{Pendiente} = \frac{0,35225503}{1,58113883} \times -0,99857152 = -0,22246740$$

$$\begin{aligned} \text{Intersección } Y &= \frac{15,88460488}{5} - \left[ \frac{-1,50514998}{5} \times (-0,22246740) \right] \\ &= 3,17692098 - [(-0,30103000) \times (-0,22246740)] = 3,10995162 \end{aligned}$$

#### **Muestra 1**

Concentración de endotoxinas

$$\text{UE/ml} = \text{antilog} \left[ \frac{3,19755621 - 3,10995162}{-0,22246740} \right]$$

$$= \text{antilog} (-0,39378622)$$

$$= 0,404 \text{ EU/ml}$$

#### **Muestra 2**

Concentración de endotoxinas

$$\text{UE/ml} = \text{antilog} \left[ \frac{2,97451169 - 3,10995162}{-0,22246740} \right]$$

$$= \text{antilog} (0,60880796)$$

$$= 4,063 \text{ EU/ml}$$

## POWERCURVE™

Si el valor absoluto del coeficiente de correlación ( $r$ ) es  $\geq 0,980$ , puede emplearse un modelo polinómico para crear una curva patrón y predecir las concentraciones de endotoxina de las muestras a analizar. Se ha determinado que este modelo polinómico (POWERCURVE™) mejora la precisión de predicción de las concentraciones de endotoxina en todo el intervalo de endotoxina (5-log). El uso del modelo POWERCURVE™ requiere la utilización del software WinKQCL™.

Al usar POWERCURVE™, se genera una curva patrón mediante los valores de tiempo de reacción  $\log_{10}$  y su correspondiente concentración de endotoxinas  $\log_{10}$  para definir una ecuación polinómica. El orden de la ecuación polinómica empleada para generar la curva de regresión viene determinado por el número de patrones de endotoxina en el ensayo. El orden del polinomio será siempre uno menos que el número de patrones de endotoxina con un máximo de un polinomio de cuarto orden para ensayos con cinco o más patrones de endotoxina y un mínimo de un polinomio de segundo orden para ensayos con tres patrones.

Se hallan soluciones a estas ecuaciones polinómicas rápidamente con el software WinKQCL™ POWERCURVE™. La información abajo proporcionada es un ejemplo de una solución a una ecuación polinómica que usa el mismo conjunto de datos del ejemplo de correlación lineal de la página 18.

### Modelo polinómico (POWERCURVE™)

---

$$Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$$

---

$$A = 3,0837355$$

---

$$B = -0,2043195$$

---

$$C = 0,0289368$$

---

$$D = -0,0059597$$

---

$$E = -0,0050336$$

---

Los parámetros de la curva patrón aparecen en la impresión del informe. El software WinKQCL™ POWERCURVE™ utiliza estos parámetros para calcular la concentración de endotoxina correspondiente a partir del tiempo de reacción de cada muestra. El software ajusta automáticamente el valor final del **resultado de la prueba** para tener en cuenta cualquier posible dilución del producto.

Es importante señalar que el modelo polinómico de POWERCURVE™ **NO PUEDE** emplearse para ensayos de **cualificación inicial**. Todavía debe utilizarse la regresión lineal en esos casos. Adicionalmente, el modelo polinómico de POWERCURVE™ solo se ha evaluado con los reactivos Kinetic-QCL™ y PYROGENT™-5000 suministrados por Lonza.

## Inhibición del producto

La inhibición del producto se da cuando algunas sustancias de la muestra a analizar interfieren con la reacción LAL. En el ensayo Kinetic-QCL™, esta inhibición resulta en un tiempo de reacción mayor e indica concentraciones menores de endotoxina que los que en realidad puedan haber en la muestra a analizar. Esta ausencia de inhibición del producto debe determinarse en cada muestra específica, ya sea sin diluir o con una dilución adecuada.

Para verificar la ausencia de inhibición del producto, se añade una cantidad conocida de endotoxina a una alícuota de la muestra a analizar (o una dilución de la muestra a analizar).

Se recomienda que la adición de endotoxina resulte en una concentración de endotoxina final de la muestra igual a 0,5 UE/ml. En las muestras que puedan contener una concentración de endotoxina de base >1 UE/ml, la adición de endotoxinas debe resultar en una concentración de endotoxina final de 5,0 UE/ml.

En un ensayo de inhibición/potenciación, la solución a la que se ha añadido endotoxina (CPP) se analiza junto a la muestra a la que no se ha añadido nada, y se calculan automáticamente sus respectivas concentraciones de endotoxina, así como la endotoxina recuperada en la muestra a la que se añadió endotoxina. La endotoxina recuperada debe ser igual que la concentración conocida del añadido entre 50 y 200 %<sup>8</sup>.

Puede prepararse una alícuota del añadido de la muestra a analizar (o dilución), al igual que en uno de los siguientes ejemplos:

### **Método en tubo**

Transfiera 50 mcl de la solución de 50,0 UE/ml en 4,95 ml de la muestra a analizar (o dilución). Esta solución contiene una concentración de endotoxina de 0,5 UE/ml en la muestra a analizar (o dilución). Esta muestra debe mezclarse enérgicamente en un agitador tipo vórtex durante un minuto antes de su uso.

Transfiera 100 mcl de esta solución a una placa de 96 pocillos, tal y como indica la plantilla del ensayo.

### **Método en placa n.º 1**

Transfiera 10 mcl de la solución de 5,0 UE/ml en cada uno de los pocillos CPP de la placa de 96 pocillos, tal y como indica la plantilla del ensayo. En estos pocillos, añada 0,1 ml de la muestra a analizar (o dilución). Cada pocillo contendrá ahora una solución de 0,5 UE/ml. Mezcle con delicadeza dando golpecitos en el lateral de la placa.

## Método en placa n.º 2

Coloque 0,1 ml de la muestra de prueba (o dilución) en los pocillos CPP de la placa de 96 pocillos, tal y como indica la plantilla del ensayo. Añada en estos pocillos 10 mcl de la solución de 5,0 UE/ml. Cada pocillo contendrá ahora una solución de 0,5 UE/ml. Mezcle con delicadeza dando golpecitos en el lateral de la placa.

Si resulta que la muestra a analizar (o dilución) es inhibidora a la reacción Kinetic-QCL™, la muestra puede requerir una mayor dilución hasta que se supere la inhibición.

**Ejemplo: determinación de una dilución no inhibidora.**

Dilución de la muestra	Endotoxina recuperada
1/10	0,125 Inhibidora
1/20	0,212 Inhibidora
1/40	0,550 No inhibidora

Inicialmente, quizás se desee examinar la inhibición del producto probando diluciones al 1/10 de la muestra a analizar. Una vez se determine la dilución no inhibidora aproximada, puede hallarse la dilución exacta probando diluciones al 1/2 alrededor de esta dilución.

## Limitaciones e indicaciones

El grado de inhibición o potenciación dependerá de la concentración del producto. Si hay que analizar varias concentraciones del mismo producto, será necesario establecer características de rendimiento para cada una por separado.

Pueden hallarse patrones de inhibición o de potenciación distintos a los hallados en la prueba tradicional de gelificación de LAL.

Puede ser necesario ajustar el pH de la muestra entre 6,0 y 8,0 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico sin endotoxinas para superar la inhibición.

## Muestras coloreadas

Como la lectura de absorbancia inicial de cada pocillo se usa como su propio blanco, las muestras con un color significativo por sí mismas no presentan un problema especial. Si el color de fondo es  $\geq 1,5$  unidades de absorbancia, entonces la muestra debe diluirse y reanalizarse.

## Curva estándar archivada

El software WinKQCL™ puede ejecutarse utilizando una curva patrón archivada. Siempre que los números actuales de lote del reactivo Kinetic-QCL™, el agua reactivo LAL y la endotoxina, así como los parámetros del lector de microplacas correspondan con los utilizados para generar la curva patrón válida archivada, esta puede utilizarse en lugar de colocar nuevos patrones de endotoxina en la placa de 96 pocillos.

Si se utiliza una curva patrón archivada, debe analizarse un solo control patrón que contenga una concentración de endotoxina igual al punto medio, en base de log, entre la concentración de endotoxina de los patrones de endotoxina mayor y menor de la curva patrón archivada. La concentración de endotoxinas predicha debe estar  $\pm 25\%$  de su propio valor.

Por ejemplo, en un ensayo dentro de una curva patrón que cubra de 50,0 a 0,005 UE/ml, debe analizarse un control-patrón igual a 0,5 UE/ml.

log 50,0	=	1,6990
log 0,005	=	-2,3010
<hr/>		
log promedio	=	-0,3010
antilog -0,3010	=	0,5

En un ensayo dentro de una curva patrón que cubra de 1,0 a 0,01 UE/ml, debe analizarse un control-patrón igual a 0,1 UE/ml.

log 1,0	=	0,0000
log 0,01	=	-2,0000
<hr/>		
log average	=	-1,0000
antilog -1,0000	=	0,1

## Correlación con otros métodos

La FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU.) regula el uso oficial de las pruebas de LAL en los Estados Unidos. La concentración de las distintas preparaciones de endotoxina varía tanto en la prueba tradicional con gel como en el método cromógeno tradicional. El patrón de endotoxina incluido en este kit se ha comparado con la endotoxina patrón de referencia (EPR) de la USP (Farmacopea Estadounidense) mediante el ensayo Kinetic-QCL™, y la concentración es de 50,0 UE/ml cuando se reconstituye con el volumen especificado en el certificado de análisis específico del lote. La curva de calibración diluida a partir de este patrón presentará un intervalo de 0,005 a 50,0 unidades de endotoxina/ml en relación a la EPR. Sin embargo, debe recordarse que la prueba tradicional con gel se estandariza con diluciones al 1/2, con lo que las variaciones parecerán bastante grandes en comparación con las de la prueba Kinetic-QCL™, en la que la estandarización es continua y las variaciones son mínimas.

## Nota para nuestros clientes internacionales

Otras agencias reguladoras pueden adoptar otros estándares de rendimiento que deberán satisfacerse para lograr la conformidad en sus jurisdicciones.

## Referencias

1. Bang, F.B. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 98:325 [1956].
2. Levin, J. and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115:265 [1964].
3. Levin, J. and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 115:337 [1964].
4. Levin, J. and F.B. Bang. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19:186 [1968].
5. Solum, N.O. Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 23:170 [1970].
6. Solum, N.O. The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. *Thromb. Res.* 2:55 [1973].
7. Young, N.S., J. Levin, and R.A. Prendergast. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. *J. Clin. Invest.* 51:1790 [1972].
8. United States Pharmacopeial Convention. General Chapter <85> Bacterial Endotoxins Test. *United States Pharmacopeia* [USP].
9. European Directorate for the Quality of Medicines. Chapter 2.6.14 Bacterial Endotoxins Test. *European Pharmacopoeia* [EP].
10. Ministry of Health, Labour, and Welfare, General Chapter 4.0.1 Bacterial Endotoxins Test. *Japanese Pharmacopoeia* [JP].
11. U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, *Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers* [June 2012].

## Notas

## Información de contacto

### Norteamérica

Servicio al cliente: +1 800 638 8174 (gratuito)  
order.us@lonza.com  
Asistencia científica: +1 800 521 0390 (gratuito)  
scientific.support@lonza.com

### Europa

Servicio al cliente: +32 87 321 611  
order.europe@lonza.com  
Asistencia científica: +32 87 321 611  
scientific.support.eu@lonza.com

### International

Contacte con su distribuidor local de Lonza  
Servicio al cliente: +1 301 898 7025  
Fax: +1 301 845 8291  
scientific.support@lonza.com

### Oficinas internacionales

Australia	+61 3 9550 0883
Bélgica	+32 87 321 611
Brazil	+55 11 2069 8800
Francia	0800 91 19 81 (gratuito)
Alemania	0800 182 52 87 (gratuito)
India	+91 40 4123 4000
Japón	+81 3 6264 0660
Luxemburgo	+32 87 321 611
Singapur	+65 6521 4379
Holanda	0800 022 4525 (gratuito)
Reino Unido	0808 234 97 88 (gratuito)

---

Lonza Walkersville, Inc. – Walkersville, MD 21793

ELx808™ es una marca comercial de BioTek  
Instruments, Inc

A no ser que se indique lo contrario, todas las marcas comerciales del presente documento son marcas de Lonza Group Ltd o de sus filiales. La información aquí contenida se considera correcta y corresponde con los últimos conocimientos científicos y técnicos. Sin embargo, no se ofrece garantía alguna, ni explícita ni implícita, relativa a su precisión o a los resultados que se obtengan del uso de tal información, ni se ofrece garantía explícita ni implícita relativa a la utilización de estos productos. El comprador acepta todo el riesgo de su utilización/manejo. Los usuarios deben tomar su propia decisión y quedar satisfechos de que los productos suministrados por Lonza Group Ltd o sus filiales, así como la información y las recomendaciones proporcionadas por Lonza Group Ltd o sus filiales son (i) aptos para el proceso o propósito deseado, (ii) son conformes con las regulaciones medioambientales, de salud y de seguridad, y (iii) no infringirán derechos de propiedad intelectual de terceros.

© 2015 Lonza  
Todos los derechos reservados.  
P50-650U-14-ES 12/15

RT-MN008-ES