

## 330. ENSAYOS DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

El ensayo de endotoxinas bacterianas se aplica a la determinación o cuantificación de endotoxinas provenientes de las bacterias Gram negativas, empleando como reactivo, lisados de amebocitos circulantes del cangrejo herradura de *Limulus polyphemus* (ensayo LAL), de *Tachypleus tridentatus*, etc. Cuando se enfrenta el reactivo a soluciones que contienen endotoxinas produce gelificación. La reacción requiere la presencia de cationes bivalentes. La velocidad de la reacción depende de la concentración de endotoxina, del pH y de la temperatura. El lisado contiene un sistema enzimático que actúa en cascada y que se activa progresivamente en presencia de endotoxinas. Como resultado final, la proteína coagulable (coagulígeno) se transforma en un gel (coagulina), siendo la base del método de gel en tubo.

Se han desarrollado otros métodos basados en los cambios turbidimétricos que ocurren durante la formación del gel y métodos cromogénicos, basados en el desarrollo de color luego del clivaje de un péptido sintético que contiene un cromóforo. Estos métodos permiten estimaciones cuantitativas del contenido de endotoxina, mientras que el método de gel en tubo se emplea como ensayo límite y también como método semicuantitativo. Los métodos cuantitativos podrán emplearse si satisfacen los requisitos para métodos alternativos (ver *Consideraciones generales*) pero, en caso de discrepancias, el resultado obtenido con el método de gel en tubo es el definitorio.

Los métodos descriptos en este capítulo son:

- a) gel en tubo: ensayo límite y semicuantitativo;
- b) cromogénico de punto final;
- c) cinético cromogénico;
- d) cinético turbidimétrico.

El ensayo debe realizarse en condiciones tales de evitar la contaminación microbiana.

Antes de llevarlo a cabo es necesario verificar:

1) que todos los materiales y reactivos a usar no contengan endotoxinas bacterianas.

2) la sensibilidad del lisado,  $\lambda$ , de acuerdo a los requisitos posteriormente descriptos en cada método.

3) la ausencia de factores interferentes en las muestras a analizar. Los resultados son válidos siempre que se haya demostrado previamente que las muestras a analizar no inhiban ni intensifiquen la reacción.

### Materiales y reactivos

Es necesaria la aplicación de tratamientos controlados para la eliminación de endotoxinas.

Para el material de vidrio, el método más empleado es el calentamiento a 250 °C por lo menos durante 30 minutos o 180 °C durante 3 horas. Si se emplean materiales plásticos de único uso (microplacas, puntas para pipetas automáticas, etc.) es necesario verificar que los mismos estén libres de endotoxinas y que no interfieran con el ensayo.

*Agua reactivo* - El agua empleada en este ensayo debe estar libre de endotoxinas. Puede ser preparada por destilación doble o triple y debe ser recolectada en envases convenientemente despirogenados. Es necesario efectuar el control de calidad de la misma, que debe cumplir con las condiciones del ensayo.

*Reactivo LAL* (Lisado de Amebocitos) - Reconstituir el lisado según se indica en el rótulo y/o prospecto. La sensibilidad del lisado,  $\lambda$ , establecida en el rótulo y que debe ser confirmada, se expresa en Unidades de Endotoxina por ml (UE/ml).

*Otras soluciones* - El ácido clorhídrico 0,1 N y el hidróxido de sodio 0,1 N, empleados para ajustar el pH entre 6,0 y 8,0, deben prepararse con *Agua reactivo*.

*Endotoxina de referencia y Endotoxina control* - Existe una *Endotoxina de referencia internacional*. Se designa a la unidad de endotoxina como unidad internacional, siendo la relación 1 UI = 1 UE. En esta Farmacopea se designa a la unidad como UE (Unidad de endotoxina).

La *Endotoxina control* es una preparación de endotoxina distinta de la *Endotoxina de referencia*, que se ha calibrado contra esta última. Las endotoxinas deben ser reconstituidas con *Agua reactivo*, mediante agitación con mezclador por vórtice, de acuerdo a las indicaciones de los rótulos y certificados de calibración. Estos concentrados se pueden conservar en heladera el tiempo especificado por el elaborador. Para la preparación de soluciones de endotoxinas, agitar vigorosamente con mezclador por vórtice los concentrados de endotoxinas durante no menos de 5 minutos y preparar diluciones seriadas en *Agua reactivo* con tiempos de agitación que pueden variar entre 30 segundos y 1 minuto. No se deben almacenar las diluciones porque pueden perder actividad por adsorción al vidrio.

### Límite de Endotoxinas

En las monografías individuales de materia prima y producto terminado, bajo el subtítulo de *Ensayo de endotoxinas bacterianas* se indica el límite de endotoxinas requerido para el producto.

Es necesario demostrar que los productos a analizar contienen una concentración de endotoxinas bacterianas menor al límite especificado. La misma se expresa en unidades entotóxicas por peso (UE/mg), por droga activa (UE/UI) o por volumen (UE/ml).

Cuando no se cuenta con especificación de límite de endotoxinas en las monografías, se puede calcular tomando en cuenta la dosis y vía de administración, empleando la dosi siguiente:

$$K/M$$

en la cual  $K$  es la dosis máxima de endotoxinas admitida (UE) por Kg de peso corporal en humano y  $M$  es la dosis máxima (en mg o UI) recomendada para ser administrada por Kg de peso corporal en humanos.

-Para administración parenteral  $K$  es igual a 5 UE/Kg.

- Para administración intratecal  $K$  es igual a 0,2 UE/Kg.

Para productos (usualmente cancerígenos) administrado por metro cuadrado de superficie corporal, la fórmula es:

$$K/M$$

en la cual  $K$  es igual a 5 UE/Kg y  $M$  es [(máxima dosis/m<sup>2</sup>/hora) × 1,80 m<sup>2</sup>]/70 Kg.

Para productos radiofármacos de administración parenteral el límite de endotoxinas se calcula empleando la fórmula siguiente:

$$175/V$$

y para la administración intratecal,

$$14/V$$

en la cual  $V$  es la dosis máxima recomendada en ml para ser administrada en humanos.

### MÉTODO DE GEL EN TUBO

El método de gel en tubo permite establecer la presencia de endotoxinas bacterianas empleándose como ensayo límite o como determinación semicuantitativa; el punto final es la constitución de un gel firme. La determinación del punto final de la reacción se hace mediante comparación directa con una *Endotoxina control* o *de referencia*; y las cantidades de endotoxina se expresan en las unidades de endotoxinas definidas. El pH de la mezcla a ensayar y del *Reactivo LAL* debe estar comprendido entre 6,0 y 8,0, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. El pH puede ajustarse, antes del ensayo, por el agregado de hidróxido de sodio

0,1 N, ácido clorhídrico 0,1 N o soluciones reguladoras apropiadas estériles y libres de endotoxinas.

La determinación de endotoxinas sobre dispositivos médicos debe realizarse sobre extractos, eluatos o soluciones de lavado según la naturaleza del dispositivo.

Antes de llevar a cabo la determinación, se deben realizar los ensayos de confirmación de sensibilidad del lisado y de inhibición o intensificación.

### Ensayo para la confirmación de la sensibilidad del lisado

La sensibilidad del lisado se define como la menor concentración de endotoxinas que puede formar un gel firme en las condiciones del ensayo. Se debe confirmar la sensibilidad indicada en el rótulo del *Reactivo LAL* de cada lote, empleando *Endotoxina control* o *de referencia*.

Preparar una serie de diluciones de *Endotoxina control* o *de referencia* con concentraciones de 2 λ; 1 λ; 0,5 λ y 0,25 λ, por cuadruplicado; siendo λ, la sensibilidad declarada en el rótulo del *Reactivo LAL* en UE/ml. Incluir controles negativos. La media geométrica en el punto final (ver *Cálculos*) debe ser mayor o igual a 0,5 λ, y menor o igual a 2 λ.

### Máxima dilución válida (MDV)

La máxima dilución válida es la dilución máxima de la muestra que corresponde a la máxima dilución en la cual el límite de endotoxina puede ser determinado en las condiciones del ensayo.

Se aplica a soluciones inyectables o a soluciones de administración parenteral reconstituidas o diluidas para su administración o, cuando sea aplicable, a la droga en peso si el volumen de administración de la forma farmacéutica pudiera ser variable.

El cálculo se realiza empleando la fórmula siguiente:

$$MDV = L_E C / \lambda$$

en la cual  $L_E$  representa el límite de endotoxina y  $C$  la concentración del principio activo en la solución a ensayar o reconstituido, que según las especificaciones del elaborador puede estar dada en:

- mg por ml, si el límite de endotoxina especificado en la monografía es en UE/mg.

- UI/ml, si el límite de endotoxina especificado en la monografía es en UE/UI.

Cuando en la monografía, el límite de endotoxina especificado es en UE/ml, se debe dividir el límite de endotoxina por λ (que es la sensibilidad del lisado, en UE/ml, declarada en el rótulo).

### **Ensayo de inhibición o intensificación**

El ensayo de inhibición o intensificación se debe repetir cada vez que se emplee un nuevo lote de *Reactivo LAL* o la formulación del producto.

Llevar a cabo el ensayo sobre alícuotas de la muestra o sobre una dilución que no exceda la máxima dilución válida (MDV), en las cuales no exista endotoxina detectable. El ensayo se realiza sobre la muestra sin adición y con adición de endotoxina; en este caso, preparar las diluciones de muestra de manera de obtener concentraciones finales de endotoxina de 2,0  $\lambda$ ; 1,0  $\lambda$ ; 0,5  $\lambda$ ; 0,25  $\lambda$ . Probar en paralelo las mismas concentraciones de endotoxina en *Agua reactivo* y los controles negativos de éste. Ensayar cada solución al menos por cuadruplicado. Calcular la media geométrica de la concentración del punto final según se indica en *Cálculos*.

El ensayo sólo es válido si la sensibilidad del *Reactivo LAL*, determinada en presencia de la preparación ensayada, no difiere en más de un factor de 2 con respecto a la determinada en *Agua reactivo*; es decir, si la media geométrica de la concentración del punto final en la muestra con endotoxina es mayor o igual que 0,5  $\lambda$ , y menor o igual que 2  $\lambda$ . Si el análisis indica inhibición o intensificación repetir el ensayo empleando las muestras diluidas apropiadamente por un factor que no exceda la MDV. De este modo, para subsecuentes determinaciones de endotoxina en las muestras se debe emplear la dilución que no exceda la MDV y sea suficiente para superar la inhibición o intensificación.

Otras formas de eliminar interferencias, además de las diluciones, pueden ser filtraciones, neutralizaciones, diálisis o adición de sustancias que desplacen la endotoxina adsorbida. El empleo de un *Reactivo LAL* de mayor sensibilidad permite realizar diluciones mayores de las preparaciones a ensayar y contribuye a la eliminación de interferencias. Si bajo las condiciones del ensayo de inhibición o intensificación son detectadas endotoxinas endógenas en las muestras no tratadas, las mismas pueden adecuarse separando la endotoxina presente por ultrafiltración, siempre y cuando esta metodología permita la separación de la endotoxina del producto.

*Procedimiento* - Transferir a sendos tubos de ensayo de 10 mm  $\times$  75 mm, los volúmenes indicados de: controles negativos, las diluciones seleccionadas de *Endotoxina control* o de *referencia*, la muestra sin diluir y/o las diluciones de la muestra a ensayar y los controles positivos de ésta/s (preparados por la adición de una concentración de endotoxina igual a 2  $\lambda$ ). Agregar

a cada tubo volúmenes iguales de *Reactivo LAL* reconstituido y agitar suavemente para mezclar. Colocar en un dispositivo para incubar, como por ej., un baño de agua o un calefactor apropiado, registrando exactamente la hora. Los tubos de reacción deben ser incubados simultáneamente en las mismas condiciones y realizarse al menos por duplicado. Incubar sin agitar, durante  $60 \pm 2$  minutos a  $37 \pm 1$  °C y retirar cada tubo cuidadosamente para su observación. Un resultado positivo (+) se caracteriza por la formación de un gel firme que se mantiene cuando se invierte el tubo 180°. Un resultado negativo (-) se caracteriza por la ausencia del gel o por la formación de un gel viscoso que no mantiene su integridad al invertir el tubo 180°. [NOTA: manipular los tubos con cuidado y evitar someterlos a vibraciones indeseables, porque de lo contrario pueden resultar falsos negativos].

### **Ensayo límite**

Se aplica cuando el objetivo del ensayo es comprobar que el producto a ensayar presenta un contenido de endotoxinas menor al especificado en la monografía correspondiente. Se prepara la muestra o la dilución de la misma determinada en *Ensayo de inhibición o intensificación*, que no exceda la MDV. El control positivo de la muestra se prepara mediante el agregado de una concentración de endotoxina igual a 2  $\lambda$ . El control negativo es *Agua reactivo*. Se prepara la dilución de *Endotoxina control* o de *referencia* a una concentración de endotoxina igual a 2  $\lambda$ . Cada solución debe realizarse por duplicado.

*Interpretación* - El ensayo sólo es válido cuando los controles negativos (-) y positivos (+) dan el resultado apropiado. La muestra cumple con el ensayo si el resultado de ambos duplicados de la muestra o dilución de ésta resulta negativo (-). No cumple si los duplicados resultan positivos (+). Repetir el ensayo si los duplicados no son coincidentes. Se puede repetir el ensayo hasta la MDV.

### **Ensayo Semicuantitativo**

Si se desea obtener un resultado semicuantitativo, se realizan diluciones con concentraciones decrecientes, que correspondan a series geométricas donde el cociente de cada dilución con la inmediata siguiente es una constante. Preparar los controles positivos de la muestra con una dilución que no exceda la MDV y con el agregado de una concentración de endotoxina igual a 2  $\lambda$ . Cada dilución de la muestra a ensayar debe hacerse al menos por duplicado, realizando en paralelo una serie duplicada de tubos

de reacción con diluciones de *Endotoxina control o de referencia* con concentraciones de 2,0  $\lambda$ ; 1,0  $\lambda$ ; 0,5  $\lambda$ ; 0 25  $\lambda$  y los controles negativos de *Agua reactivo*. Calcular el contenido de endotoxina según se indica en *Cálculos*.

*Interpretación* - El ensayo sólo es válido cuando los controles negativos (-) y positivos (+) dan el resultado apropiado y la media geométrica en el punto final de la *Endotoxina control o de referencia* es mayor o igual a 0,5  $\lambda$ , y menor o igual a 2  $\lambda$ . La muestra cumple con los requisitos del ensayo si la concentración de endotoxina es menor que la especificada en la monografía correspondiente.

### Cálculos

*Cálculo de la media geométrica* - El punto final es la última dilución positiva en una serie de concentraciones decrecientes de endotoxina. Registrar la concentración en cada punto final, para cada serie de diluciones.

Determinar el logaritmo de la concentración del punto final ( $e$ ) y calcular la media geométrica de la concentración del punto final por la fórmula siguiente:

$$\text{anti log}(\sum e / f)$$

en la cual  $\sum e$  es la suma de los logaritmos de las concentraciones finales de la serie de diluciones y  $f$  es el número de tubos de reacción en el punto final.

*Cálculo del contenido de endotoxina* - Calcular la concentración de endotoxinas en el producto a ensayar, por la fórmula siguiente:

$$\lambda / \text{anti log}(\sum d / f)$$

en la cual  $d$  es el logaritmo de los factores dilución del producto (expresados como fracciones), en el punto final para la muestra ensayada. [NOTA: los resultados finales deben ser expresados en las unidades de límite de endotoxina especificadas (UE/ml o UE/mg o UE/UI)].

### MÉTODOS

#### ESPECTROFOTOMÉTRICOS: turbidimétrico y cromogénico

*Método turbidimétrico* - Mide el cambio de turbidez (por absorbancia o transmitancia) durante la transformación final de la proteína coagulante en coagulina. El valor de velocidad del cambio de turbidez es función de la concentración de endotoxina. Los ensayos deben ser realizados a la temperatura de incubación de  $37 \pm 1$  °C.

*Método cromogénico* - Mide la concentración de un cromóforo liberado a partir de un péptido cromogénico contenido en una solución de

endotoxina incubada con un lisado y un sustrato peptídico cromogénico (unido a *p*-nitroanilina), empleando un espectrofotómetro a la longitud de onda apropiada para la reacción. En casos de interferencia, se puede copular el cromóforo de *p*-nitroanilina por medio de una reacción de diazotación. Existen metodologías de punto final y cinéticas.

#### Método cromogénico de punto final

En este método se detiene la reacción enzimática, a un tiempo preseleccionado, con una cantidad apropiada de ácido acético. La concentración de endotoxina en la muestra o diluciones apropiadas de la misma se determina midiendo la absorbancia e interpolando la misma en una curva de calibración preparada con soluciones de *Endotoxina control o de referencia* en *Agua reactivo*. El pH de las soluciones debe estar comprendido en el intervalo especificado por el elaborador del reactivo. Los valores de pH deben estar comprendidos entre 6,0 y 8,0. Si fuera necesario, ajustar el pH antes del ensayo, mediante el agregado de ácido clorhídrico 0,1 N o hidróxido de sodio 0,1 N o soluciones reguladoras apropiadas, estériles y libres de endotoxinas.

Los criterios de validación de la curva de calibración, la verificación de ausencia de factores interferentes y la determinación de endotoxinas en las muestras son descriptos a continuación.

*Validación de la curva de calibración* - Debe realizarse cada vez que se emplee un nuevo lote de lisado o cuando se modifique alguna condición que pueda influir en el resultado del ensayo.

Preparar al menos cuatro series de soluciones de por lo menos cuatro concentraciones de *Endotoxina control o de referencia* en *Agua reactivo*, dentro del intervalo especificado por el elaborador. La curva debe incluir el límite ( $\lambda$ ) especificado por el elaborador y un blanco de reactivos. Realizar el ensayo y graficar la absorbancia en función de la concentración de endotoxina para cada tubo. Efectuar una regresión de la curva de absorbancia en función de concentración. La recta de regresión debe tener una pendiente y linealidad significativas. El coeficiente de correlación  $r$  debe ser  $\geq 0,98$  en valor absoluto en el intervalo de concentraciones de endotoxinas indicados por el elaborador del lisado.

Determinar la concentración de endotoxina,  $\lambda$ m, a partir de la media aritmética de la concentración más alta ( $\lambda$ a) y la concentración más baja ( $\lambda$ b) para la cual la curva de regresión es lineal, siendo todos los valores expresados en UE/ml.

*Factores interferentes* - La muestra debe ser diluida de acuerdo a un factor de dilución calculado a partir de la fórmula siguiente:

#### Concentración de endotoxina límite/ $\lambda_m$

La concentración de endotoxina límite es igual a la endotoxina límite especificada o calculada, en UE/mg o UE/UI multiplicada por la concentración de la solución muestra, en mg o UI de producto por ml. Preparar al menos cuatro soluciones conteniendo *Endotoxina control o de referencia* a una concentración de  $\lambda_m$ .

Realizar el ensayo y calcular la media de la concentración de endotoxinas. Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es mayor o igual a 50 % y menor a 200 % de  $\lambda_m$ , la muestra ensayada no contiene factores interferentes. Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es menor a 50 % o mayor 200 %, los factores interferentes deben eliminarse según se indica en *Método de gel en tubo*.

Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es mayor a la concentración más alta en la parte lineal de la curva de regresión repetir el ensayo con un factor de dilución mayor de la muestra a ensayar, calculado por la fórmula siguiente:

#### Concentración de endotoxina límite/ $\lambda_m'$

en la cual  $\lambda_b < \lambda_m' < \lambda_m$ .

*Procedimiento* - Preparar las muestras, con las modificaciones apropiadas para eliminar factores interferentes y/o ajustar el pH, si fuera necesario.

En el protocolo de análisis deben prepararse las siguientes soluciones y ensayar cada solución por duplicado:

a) solución de la muestra a ensayar, en la dilución y condiciones que cumpla con el ensayo de interferencias;

b) solución de los controles positivos de la muestra por duplicado conteniendo *Endotoxina control o de referencia* a una concentración de  $\lambda_m$  o  $\lambda_m'$ , en la misma dilución de la muestra a ensayar que en (a);

c) solución de *Endotoxina control o de referencia* en *Agua reactivo* a una concentración de  $\lambda_a$ ,  $\lambda_b$  y de  $\lambda_m$  o  $\lambda_m'$ ;

d) *Agua reactivo* como control negativo.

Emplear los volúmenes indicados de las soluciones descriptas, del lisado y del cromógeno (de acuerdo a la forma de lectura, en microplaca o microcubas) e incubar el tiempo especificado por el elaborador. Detener la reacción y medir la absorbancia a la longitud de onda apropiada para la reacción.

Para realizar la curva de calibración para el análisis de las muestras, proceder según se indica en *Validación de la curva de calibración*. Calcular la concentración de endotoxina de cada solución (a) y

(b) empleando la regresión lineal obtenida con los controles (c).

El ensayo sólo es válido si se cumplen las siguientes condiciones:

- El resultado del control de *Agua reactivo* es negativo si no es mayor al límite del valor del blanco obtenido en *Validación de la curva de calibración*.

- El resultado de la solución control (c) cumple con los requisitos de *Validación de la curva de calibración*.

- La recuperación de endotoxina del control positivo no debe ser menor de 50 % ni mayor de 200 %, calculada por la media aritmética de la concentración de endotoxina de la solución (b) luego de sustraída la media aritmética de la concentración de endotoxina de la solución (a), calculando el porcentaje de recuperación dividiendo el resultado de la sustracción anterior por  $\lambda_m$  o  $\lambda_m'$  y multiplicando por 100.

El resultado de la muestra ensayada es aceptable si la concentración de endotoxina de cada uno de los duplicados es menor que  $\lambda_m$  o  $\lambda_m'$  en UE/ml. Si los resultados no son coincidentes, como por ej., si la concentración de una de las soluciones es más baja y la otra más alta que este límite, debe repetirse el ensayo. La muestra ensayada cumple con los requisitos del ensayo si ambas soluciones, en la repetición, cumplen con el límite del ensayo. Los resultados deben ser expresados en las unidades de endotoxinas límite especificadas (UE/mg, UE/ml o UE/UI).

*Interpretación* - La muestra cumple con los requisitos del ensayo si la concentración de endotoxina es menor que la especificada en la monografía correspondiente.

#### **METODOS CINÉTICOS: turbidimétrico y cromogénico**

*Método turbidimétrico* - Mide el tiempo de reacción necesario para el desarrollo de un grado predeterminado de turbidez de una solución sobre la cual se agrega lisado, empleando un aparato apropiado.

*Método cromogénico* - Mide el tiempo de reacción necesario para el desarrollo de una intensidad predeterminada de color después de la liberación de un péptido cromogénico, empleando un espectrofotómetro a la longitud de onda apropiada.

En ambos métodos cinéticos, el logaritmo del tiempo de reacción guarda una relación lineal con el logaritmo de la concentración de endotoxina.

Los criterios de validación de la curva de calibración, la verificación de ausencia de factores interferentes y la determinación de endotoxinas en

las muestras a ensayar son descriptos a continuación.

*Validación de la curva de calibración* - Debe realizarse cada vez que se emplee un nuevo lote de lisado o cuando se modifique alguna condición que pueda influir en el resultado de ensayo.

Preparar al menos dos series de soluciones de por lo menos cuatro concentraciones de *Endotoxina control* o de *referencia* en *Agua reactivo*, dentro del intervalo requerido (no se recomienda emplear concentraciones más allá de los límites especificados por el elaborador). Emplear un control negativo de *Agua reactivo*. Agregar a cada tubo volúmenes iguales de lisado y, para el *Método cromogénico*, el volumen apropiado de péptido cromogénico. Medir el tiempo de reacción como se definió anteriormente. Graficar el logaritmo del tiempo de reacción en función del logaritmo de la concentración de cada tubo y efectuar un análisis de regresión de la curva correspondiente, empleando un método apropiado, como por ej., regresión lineal. La recta de regresión debe tener una pendiente y linealidad significativas. El coeficiente de correlación  $r$  debe ser  $\geq 0,98$  en valor absoluto en el intervalo de concentraciones de endotoxinas especificado por el elaborador del lisado.

Determinar la cantidad de concentraciones equidistantes exponencialmente para las cuales la curva de regresión es lineal. Si ésta es 3 ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$ ), emplear la segunda concentración ( $\lambda_2$ ) como  $\lambda_m$  en el ensayo de factores interferentes y en el ensayo para determinación de endotoxinas en la muestra a ensayar. Si es igual a 4 ó 5, emplear la tercera concentración ( $\lambda_3$ ) como  $\lambda_m$ .

*Factores interferentes* - La muestra a ensayar debe ser diluida de acuerdo a un factor de dilución calculado a partir de la fórmula siguiente:

Concentración de endotoxina límite/  $\lambda_m$

La concentración de endotoxina límite es igual a la endotoxina límite especificada o calculada, en UE/mg o UE/UI multiplicada por la concentración de la solución, en mg o UI de producto por ml. Preparar al menos cuatro soluciones conteniendo *Endotoxina control* o de *referencia* a una concentración de  $\lambda_m$ .

El pH de las soluciones debe estar comprendido en el intervalo especificado por el elaborador. Este es generalmente entre 6,0 y 8,0.

Si fuera necesario ajustar el pH, antes del ensayo, por el agregado de ácido clorhídrico 0,1 N o hidróxido de sodio 0,1 N o soluciones reguladoras apropiadas, estériles y libres de endotoxinas.

Realizar el ensayo con estas cuatro soluciones y calcular la media de la concentración de endotoxinas como el antilogaritmo de la media

logarítmica de concentración de endotoxinas. Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es por lo menos el 50 % de  $\lambda_m$ , la muestra ensayada no contiene factores que puedan interferir con la actividad del lisado bajo las condiciones del ensayo; las muestras pueden entonces ser analizadas sin tratamiento previo para eliminar estas interferencias. Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es menor a 50 %, los factores interferentes deben ser eliminados según se indica en *Método de gel en tubo*.

Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es mayor a la concentración más alta en la parte lineal de la curva de regresión, repetir el ensayo con un factor de dilución mayor de la muestra a ensayar, calculado por la fórmula siguiente:

Concentración de endotoxina límite/  $\lambda_m'$

en la cual  $\lambda_b < \lambda_m' < \lambda_m$ .

*Procedimiento* - Preparar las muestras, con las modificaciones apropiadas para eliminar factores interferentes y/o ajustar el pH, si fuera necesario.

En el protocolo de análisis deben prepararse las siguientes soluciones y ensayar cada solución por duplicado:

a) solución de las soluciones de la muestra a ensayar en la dilución que cumpla con el ensayo de interferencias;

b) solución de los controles positivos de la muestra, conteniendo *Endotoxina control* o de *referencia* a una concentración de  $\lambda_m$  o  $\lambda_m'$  en la misma dilución de la muestra a analizar que en (a).

c) solución de tres concentraciones logarítmicamente equidistantes de *Endotoxina control* o de *referencia* que cubran la parte lineal de la curva de regresión.

d) *Agua reactivo* como control negativo.

Para realizar la curva de calibración para el análisis de las muestras, proceder según se indica en *Validación de la curva de calibración*. Calcular la concentración de endotoxina de cada solución (a) y (b) empleando la regresión lineal generada por los controles (c).

El ensayo es válido si se cumplen las siguientes condiciones:

- El resultado del control de *Agua reactivo* es negativo si no es mayor al límite del valor del blanco obtenido en *Validación de la curva de calibración*.
- El resultado de la solución control (c) cumple con los requisitos de *Validación de la curva de calibración*.
- La recuperación de endotoxina del control positivo no debe ser menor de

50 % ni mayor de 200 % de  $\lambda_m$  o  $\lambda_{m'}$ , calculada por la media aritmética de la concentración de endotoxina de la solución (b) luego de sustraída la media aritmética de la concentración de endotoxina de la solución (a), calculando el porcentaje de recuperación dividiendo el resultado de la sustracción anterior por  $\lambda_m$  o  $\lambda_{m'}$  y multiplicando por 100.

El resultado de la muestra ensayada es aceptable si la concentración de endotoxina de cada uno de los duplicados es menor que  $\lambda_m$  o  $\lambda_{m'}$  en UE/ml. Si los resultados no son coincidentes, como por ej., si la concentración de una de las soluciones es menor y la otra mayor que este límite, debe repetirse el ensayo. La muestra ensayada cumple con los requisitos del ensayo si ambas soluciones, en la repetición, cumplen con el límite del ensayo. Los resultados deben ser expresados en las unidades de endotoxinas límite especificadas (UE/mg, UE/ml o UE/UI).

*Interpretación* - La muestra cumple con los requisitos del ensayo si la concentración de endotoxina es menor que la especificada en la monografía correspondiente.